



# Le rôle de la Fragile X Mental Retardation Protein et de alpha CamKII dans la plasticité des cellules granulaires du bulbe olfactif en réponse à l'apprentissage

Laura Daroles

## ► To cite this version:

Laura Daroles. Le rôle de la Fragile X Mental Retardation Protein et de alpha CamKII dans la plasticité des cellules granulaires du bulbe olfactif en réponse à l'apprentissage. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066037 . tel-01361321

**HAL Id: tel-01361321**

**<https://theses.hal.science/tel-01361321>**

Submitted on 7 Sep 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale cerveau, cognition, comportement

*Neuroscience Paris Seine/ Équipe Développement et Plasticité des Réseaux Neuronaux*

## **Le rôle de la Fragile X Mental Retardation Protein et de $\alpha$ CamKII dans la plasticité des cellules granulaires du bulbe olfactif en réponse à l'apprentissage.**

Par Laura Daroles

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Isabelle Caillé

Présentée et soutenue publiquement le 14 janvier 2016

Devant un jury composé de :

Caillé Isabelle	Directrice de thèse
Rampon Claire	Rapporteuse
Raineteau Olivier	Rapporteur
De Chevigny Antoine	Examineur
Fleischmann Alexander	Examineur
Zalc Bernard	Examineur



## Remerciements

je vais tâcher de n'oublier personne. Si j'oublie quelqu'un je m'engage à lui payer un verre après ma soutenance pour me faire pardonner...

D'abord la première personne que je tiens particulièrement à remercier, c'est Isabelle. Ça a réellement été une chance de t'avoir en tant que directrice de thèse parce que tu es une scientifique brillante et pleine d'idées géniales et surtout une femme admirable. Tu as été absolument fabuleuse ! Merci d'avoir élaboré ce projet génial, et le mener avec toi a vraiment été un plaisir de chaque jour pendant 4 ans ! Tu as toujours été disponible pour discuter, ou même pour m'aider à faire certaines manip (comme les synaptosomes, ou les neurosphères qui nous ont causé bien du souci. Sans oublier toutes les chirurgie que tu as faites...). Merci pour ta présence, ta joie non dissimulée quand les choses marchent et les discussions qui pouvait durer des heures quand ça ne marchait pas... Mais (je sais, on ne commence pas une phrase par mais... Mais là c'est les remerciements !) surtout merci pour tout ce qu'on a pu partager en tant qu'amies depuis le début. On peut dire qu'on a traversé beaucoup de crises... de fous rire ensemble ! Merci pour les tous les sushis, les déjeuners au soleil, pour toutes les sessions shopping (alors qu'en attendant, les japonais, eux ils publient !), pour toutes les discussions à refaire le monde (avec ou sans alcool !), pour ton soutien qu'il soit scientifique ou non, pour avoir été là quand ça n'allait pas. C'est grâce à toi que je me suis autant épanouie dans ce projet. Tous les jours, c'était un plaisir de venir au labo, de travailler et de rire à la fois avec toi. Je pourrais encore en écrire des tartines, mais de toute façon il n'y a pas de mot assez ouf pour te dire merci... Grave !

Merci à Alain pour l'accueil dans le labo et pour les lettres de recommandations demandées quelques heures avant la deadline...

Merci à Coralie d'avoir partagé tout ce coca (zero ou light) et tout ce café sur les marches de la passerelle. Merci pour tes conseils toujours avisés sur les manips, pour les danses de folie à différentes occasions bien arrosées, et merci pour ton oreille amicale.

Merci à Quentin et Oriane pour les km parcourus ensemble dans Paris et pour les discussions là encore pas toujours scientifiques.

Merci à Benjamin pour les séances de piscine et pour la tchatche en pièce de culture.

Merci à Isabelle D. parce que (lorsque tu as le temps ;-)) c'est agréable de discuter avec toi !

Merci à Mohamed pour toutes les stats que tu as faites sur mes données, c'était un très gros travail ! Et réalisé dans les règles de l'art !

Merci à Caroline D. pour tes conseils toujours précieux. Et parce qu'on peut compter sur toi pour savoir où tout se trouve.

Merci à Monica, Simona, Leslie, Sabrina qui ont fait chacune un passage dans le labo dont je me souviendrai pour toujours !

Merci à Vidji qui a génotypé toutes les souris, ou presque, qui sont passées entre mes mains.

Merci à Maryse pour les centaines de litres de paraformaldéhyde et pour toujours ouvrir la fenêtre le matin avant qu'on arrive, parce que sinon ça sent mauvais dans le labo...

Merci à Marie-Pierre pour les sourires dans le couloir et d'avoir supporté la musique que je mets toujours trop fort...

Merci à Susanne et Jean-François de la plateforme d'imagerie où j'ai passé beaucoup de temps... merci pour vos conseils. Un merci particulier à Richard qui a passé beaucoup de temps à me distraire pendant mes longues heures au confocal.

Merci à Léa, Jennifer et Mallion qui, tout à tour, se sont occupées de mes lignées de souris.

Merci à Marika, pour l'accueil dans la plateforme de phénotypage et pour ses conseils.

Merci à Anne Didier, Nathalie Mandairon et Anne Ziessel qui m'ont accueillie dans leur labo à Lyon et qui m'ont appris ce qui a été la base de mon travail de thèse.

Merci à Marc, Marine, Vincent de l'équipe Caboche qui ont été des supers voisins pendant le début de ma thèse !

Thank you Malou for all the moments we shared talking about music, danse, sewing, drawing, singing,... anything but science !

Voilà ça c'était tous les gens qui m'ont aidé, soutenue, fait rire au labo et en dehors. Maintenant je tiens à remercier tous les piliers sur lesquels je m'appuie depuis toujours et plus particulièrement dans cette période intense du début de ma vie de scientifique.

Merci à mes parents. C'est quand même grâce à vous je suis arrivée jusqu'ici, parce que vous avez toujours été présents.

Merci à Johanna et Kevin qui sont des exemples de génies !

Merci à Cyril, parce que depuis que je te connais tu me fais l'effet d'une perfusion de bonheur en plein cœur qui parcourt mon corps et les moindres recoins de mon cerveau. Merci d'être curieux de ce que je fais et de me supporter dans mes délires chaque jour. Que l'aventure continue à l'autre bout du monde !

Merci à ma belette, Sarah, d'être là quoiqu'il arrive pour me rassurer quand je fais une crise de manque de confiance en moi. Merci de croire en moi !

Merci à ma Nhélène d'être toujours prête pour prendre un verre réconfortant ou célébrer les petites comme les grandes victoires !

Merci à ma Xelloupinette de ne pas m'oublier même si je suis tellement occupée que j'en oublie de donner des nouvelles !

Merci à Alice et Arlette pour tous les mojitos qui ont bien stimulé ma matière grise et pour ces discussions jusqu'à pas d'heure en pleine semaine.

Merci à Anaïs de toujours être à l'écoute et de toujours être prête pour un simple verre, un ciné, une soirée enflammée sur le dancefloor ou un festival pour se défouler!

Merci à Victor qui m'a bien soutenue pendant le concours de l'école doctorale et de toujours demander des nouvelles de l'avancement de la thèse.

Merci à Pretty, qui m'a aidée pendant deux mois sur le projet et qui a toujours demandé des nouvelles depuis.

Merci à Ayoub, Claire, Steve pour leur curiosité naturelle.

Enfin merci à coca-cola pour le soutien quotidien, heure par heure, depuis X années et tout particulièrement pendant cette période d'écriture !

# Table des matières

Liste des abréviations .....	9
Liste des figures.....	11
Préambule .....	12
Introduction.....	13
<b>1. La plasticité, à la base de l'apprentissage et de la mémoire .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Qu'est ce que la plasticité du cerveau? .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 La plasticité structurelle.....</b>	<b>15</b>
i. La structure d'une synapse active .....	16
ii. Elimination et création d'épines .....	17
iii. Morphologie des épines .....	18
iv. Remodelages dendritiques.....	20
<b>1.3 La neurogénèse adulte .....</b>	<b>21</b>
i. La production des nouveaux neurones dans la zone sous-ventriculaire (ZSV).....	21
ii. Différenciation et intégration synaptique des nouveaux neurones dans le BO .....	21
iii. La plasticité extraordinaire des nouveaux neurones .....	23
a. Les périodes critiques des nouveaux neurones .....	24
b. Les nouveaux neurones subissent des remodelages dendritiques de grande échelle .....	24
<b>2. La traduction locale .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Qu'est ce que la traduction locale ? .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Un rôle dans le développement axonal.....</b>	<b>25</b>
i. Mise en évidence .....	26
ii. La traduction locale permet aux cônes de croissance de répondre aux signaux de guidage .....	26
i. Les ARNm traduits dans les cônes de croissance.....	27
a. Les protéines associées aux cytosquelette.....	27
b. Les molécules d'adhésion.....	27
<b>2.3 Un rôle dans la plasticité des neurones matures .....</b>	<b>28</b>
i. Mise en évidence de la présence de la machinerie de traduction et d'ARNm dans les dendrites .....	28
ii. La traduction locale dendritique permet certaines formes de plasticité synaptique.....	29
iii. Les ARNm traduits dans les dendrites.....	29
<b>2.4 Eléments de régulation .....</b>	<b>31</b>
i. Les 3'UTR, codes postaux vers les synapses .....	31
ii. Les éléments <i>trans</i> .....	33
a. Les RNA Binding Proteins .....	33
b. Les ARN non codants.....	34
iii. Les granules de transport.....	35
iv. Régulation de du transport et de la traduction par l'activité .....	36
a. Régulation du transport par l'activité.....	36
b. Régulation de la synthèse protéique par l'activité .....	37
<b>3. La Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Le syndrome de l'X Fragile (SXF) .....</b>	<b>39</b>
i. Les symptômes.....	39
ii. Les modèles animaux du SXF .....	40
a. Chez la souris .....	40
b. Chez la drosophile .....	41
<b>3.2 Structure et expression de FMRP .....</b>	<b>42</b>
i. Structure de FMRP .....	42
ii. L'expression de FMRP est sensible à l'activité neuronale.....	42
<b>3.3 Rôle dans le transport des ARNm et dans la régulation de la traduction locale .....</b>	<b>43</b>

i.	Régulation du transport des ARNm .....	43
ii.	Régulation de la traduction locale.....	44
a.	FMRP inhibe la traduction locale .....	44
b.	Mécanismes d'action de FMRP sur la traduction locale.....	45
iii.	Les ARNm cibles de FMRP.....	45
<b>3.4</b>	<b><i>FMRP joue un rôle dans le développement.....</i></b>	<b>46</b>
i.	Observations <i>in vitro</i> .....	47
ii.	<i>In vivo</i> , un rôle dans les périodes critiques .....	47
a.	L'expression de FMRP est augmentée lors de certaines périodes critiques de développement. 47	
b.	Des défauts de maturation associés à des périodes critiques de développement chez les souris <i>Fmr1</i> KO et les drosophiles <i>dfmr1</i> .....	48
<b>3.5</b>	<b><i>Un rôle dans la plasticité.....</i></b>	<b>49</b>
i.	Un rôle dans la plasticité synaptique .....	49
a.	La plasticité dépendante des mGluR et la « théorie mGluR du SXF ».....	49
b.	FMRP joue un rôle dans d'autres formes de plasticité synaptique .....	50
ii.	Un rôle dans la plasticité structurelle.....	51
a.	La plasticité structurelle des épines .....	51
b.	Le rôle de FMRP dans La plasticité dendritique des nouveaux neurones du cerveau adulte ..	53
<b>4.</b>	<b>Le bulbe olfactif (BO).....</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b><i>Le système olfactif.....</i></b>	<b>54</b>
i.	L'épithélium olfactif.....	55
ii.	Le BO .....	55
a.	Les différentes couches du BO et différents types cellulaires qui les habitent.....	55
b.	La connectivité dans le bulbe olfactif.....	56
iii.	Le cortex olfactif (CO).....	57
a.	Du BO au CO.....	57
b.	Du CO au BO .....	57
<b>4.2</b>	<b><i>Les cellules granulaires du BO tiennent un rôle central dans la plasticité du BO.....</i></b>	<b>58</b>
i.	Les cellules granulaires dans le BO.....	58
a.	Hétérogénéité .....	58
b.	Connectivité des cellules granulaires.....	60
ii.	Le rôle des nouveaux neurones dans la plasticité du BO .....	62
	<b>Épines dendritiques et traduction locale .....</b>	<b>65</b>
	<b>Résultats .....</b>	<b>71</b>
<b>1.</b>	<b>FMRP et la traduction locale de <math>\alpha</math>CamKII sont nécessaires à la plasticité structurelle induite par l'apprentissage olfactif. ....</b>	<b>73</b>
<b>1.1</b>	<b><i>Résumé de l'article .....</i></b>	<b>73</b>
<b>1.2</b>	<b><i>L'article : FMRP and Dendritic Local Translation of the <math>\alpha</math>CamKII mRNA Are Required for the Structural Plasticity Underlying Olfactory Learning. ....</i></b>	<b>75</b>
<b>1.3</b>	<b><i>Supplemental information .....</i></b>	<b>87</b>
<b>2.</b>	<b>L'expression de <math>\alpha</math>CamKII définit deux sous-populations de cellules granulaires, implication de ces deux populations dans l'apprentissage perceptif.....</b>	<b>97</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Introduction .....</i></b>	<b>97</b>
i.	L'holoenzyme CamKII .....	97
ii.	Rôles de $\alpha$ CamKII dans la plasticité.....	98
a.	$\alpha$ CamKII est nécessaire à la LTP.....	98
b.	$\alpha$ CamKII est nécessaire à la maturation et à la plasticité structurelle des épines dendritiques. 98	
c.	$\alpha$ CamKII est impliquée dans la stabilisation dendritique pendant le développement.....	99
d.	$\alpha$ CamKII est impliquée dans la plasticité structurelle des nouveaux neurones du gyrus dentelé de l'hippocampe et du BO .....	99
i.	La moitié des cellules granulaires du BO expriment $\alpha$ CamKII.....	100
a.	Analyse des cellules granulaires du BO dans leur ensemble .....	100



b. Analyse des cellules nouvellement générées.....	100
ii. Les cellules granulaires $\alpha$ CamKII+ et $\alpha$ CamKII- sont deux populations distinctes .....	100
iii. Caractéristiques morphologiques et excitabilité des cellules $\alpha$ CamKII+ et $\alpha$ CamKII-.	103
a. Les deux sous-populations ne présentent pas de différences morphologiques.....	103
b. Les deux sous-populations présentent une différence d'excitabilité.....	103
<b>2.2 Résultats .....</b>	<b>105</b>
i. La plasticité structurelle des nouveaux neurones du BO associée à l'apprentissage est induite dans les cellules $\alpha$ CamKII+ uniquement.....	107
ii. L'apprentissage perceptif induit l'activation des cellules $\alpha$ CamKII+ et -. ....	109
<b>2.3 Matériel et méthodes.....</b>	<b>111</b>
i. Exposition aigue aux odorants .....	112
ii. Immunofluorescences .....	112
<b>Discussion .....</b>	<b>113</b>
<b>1. Le rôle de FMRP et de la traduction locale d'<math>\alpha</math>CamKII dans la plasticité structurelle des nouveaux neurones du BO associée à l'apprentissage olfactif. ....</b>	<b>115</b>
1.1. <i>Le rôle de FMRP dans la plasticité structurelle associé à l'apprentissage perceptif. ....</i>	<i>115</i>
i. La plasticité exceptionnelle des nouveaux neurones du BO. ....	115
ii. Les défauts d'apprentissage chez les souris cKO .....	115
1.2. <i>Le MPEP sauve les défauts d'apprentissage et de plasticité des souris cKO. ....</i>	<i>116</i>
1.3. <i>Le modèle proposé .....</i>	<i>116</i>
<b>2. L'effet différentiel de l'apprentissage perceptif sur les deux populations de cellules granulaires <math>\alpha</math>CamKII+ et <math>\alpha</math>CamKII-.....</b>	<b>118</b>
2.1 <i><math>\alpha</math>CamKII définit deux sous-populations de cellules granulaires. ....</i>	<i>118</i>
i. Caractérisation des deux sous-populations .....	118
ii. La plasticité structurelle associée à l'apprentissage perceptif n'affecte que cellules granulaires $\alpha$ CamKII+ .....	119
iii. L'apprentissage perceptif active à la fois les cellules $\alpha$ CamKII+ et $\alpha$ CamKII- .....	119
a. Comment des expositions répétées peuvent-elles induire cette activation ? .....	119
b. Les deux populations participent-elles à l'acquisition de la capacité de discrimination pendant l'apprentissage perceptif ? .....	120
<b>3. Les autres paradigmes de stimulation olfactive .....</b>	<b>120</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>121</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>123</b>

## Liste des abréviations

AAV	Addeno-Associated Virus
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate
AMPA	Récepteur AMPA
araC	Cytosine arabinoside
Arc	Activity Regulated Cytoskeleton associated protein
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BO	Bulbe Olfactif
BrdU	BromodésoxyUridine
C-ter	partie Cterminale
CG	Couche Glomérulaire
cKO	conditional Knocked Out
CMR	Courant Migratoire Rostral
CO	Cortex Olfactif
CPE	cytoplasmic Polyadenylation Element
CPEB	Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein
CyFIP	Cytoplasmic FMRP Interactig Protein
DHPG	3,5-Dihydroxyphenylglycine
DPS	Densité Post-Synaptique
DREADD	Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs
eEF1A	Facteur d'Elongation eucaryote 1A
eIF4E	Facteur d'Initiation eucaryote 4E
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FMR	Fragile X Mental Retardation
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
GABA	acide $\gamma$ -aminobutyrique
GFP	Green fluorescent Protein
hnRNPA2	heterogeneous nuclear ribonucleoproteine A2
HVC	High Vocal Center
jpi	Jour Post Injection
KO	Knocked Out
Lim-	limonène -
Lim+	limonène +
LTD	Long-Term Depression
LTP	Long-term-Potentiation
M/T	mitrale et tufted
MAP	Microtubule Associated Protein
MET	Microscopie Électronique à Transmission
mGluR	Récepteur métabotropique du Glutamate
mIPSC	potentiel post-synaptiques innibiteur miniature
miRISC	miRNA-Induced-Silencing-Complex

MMP-9	Matrix Metallopotéinase 9
MPEP	2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine
mTORC1	mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1
N-ter	partie N terminale
NFPC	NF-Protocadhérine
NMD	Non-sense Mediated Decay
NMDA	N-Methy-D-Asparatic Acid
NMDAR	Récepteur NMDA
NPG	Neurone Périglomérulaire
NSO	Neurones Sensoriel Olfactif
PB	Processing Bodies
PKA	Protein Kinase A
PP1	Protéine Phosphatase 1
PSD 95	Post Synaptic Density 95
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RBP	RNA binding Protein (Protéine de liaison aux ARN)
RNP	RiboNucleo Particle
RO	Récepteur Olfactif
Sema3A	Semaphorine 3A
SEN	Signal d'Export Nucléaire
sIPSC	potentiel post-synaptiques innibiteur spontané
SLN	Signal de Localisation Nucléaire
Snap 25	Synaptosomal-associated protein 25
SoSLIP	<i>Sod1</i> mRNA Stem Loops Interacting with FMRP
SXF	Syndrome de l'X Fragile
SynGAP	Synaptic Ras GTPase-activating protein 1
trkB	tropomyosine receptor kinase B
UTR	UnTranslated Region (région non traduite)
WT	Wild type (sauvage)
ZPB	Zipcode Binding Protein
ZSV	Zone Sous-Ventriculaire
$\alpha$ CamKII	sous-unité $\alpha$ de la Calcium-calmoduline-dependent-KinaseII

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> La synapse.	9
<b>Figure 2:</b> Les stades de maturation des nouveaux neurones du BO adulte.	23
<b>Figure 3:</b> les ARNm traduits au niveau des épines dendritique	31
<b>Figure 4 :</b> Structure de FMRP.	42
<b>Figure 5 :</b> Modèles des conséquences de l'activation des mGluR de groupe 1 sur la structure des épines dendritique et le rôle de FMRP.	48
<b>Figure 6:</b> Schéma représentant la connectivité entre les neurones de 2 <sup>nd</sup> ordre qui résident dans le bulbe olfactif, les cellules M/T, et les neurones de 3 <sup>ème</sup> ordre	58
<b>Figure 7:</b> Organisation régionale des cellules souches neurales de la ZSV.	54
<b>Figure 8:</b> La synapse dendro-dendritique.	56
<b>Figure 9 :</b> Les cellules granulaires $\alpha$ CamKII+ et $\alpha$ CamKII- sont deux populations distinctes.	102
<b>Figure 10 :</b> Les deux sous-populations ne présentent pas de différences morphologiques.	103
<b>Figure 11 :</b> Les neurones activés sont préférentiellement des cellules granulaires $\alpha$ CamKII+	104
<b>Figure 12:</b> Caractérisation électrophysiologiques des cellules granulaires $\alpha$ CamKII+ en comparaison à la population totale.	105
<b>Figure 13 :</b> Les cellules granulaires $\alpha$ CamKII+ et $\alpha$ CamKII- proviennent de régions différentes de la SVZ.	106
<b>Figure 14 :</b> La plasticité structurelle des nouveaux neurones du BO associée à l'apprentissage est induite dans les cellules $\alpha$ CamKII+ uniquement.	108
<b>Figure 15 :</b> L' apprentissage perceptif active les neurones $\alpha$ CamKII+ et -.	111

## **Préambule**

La plasticité de cerveau est importante pour l'adaptation des comportements. Des symptômes observés dans Syndrôme de l'X Fragile (SXF) et autres déficiences intellectuelles sont attribués en partie à des défauts de plasticité cérébrale. La Fragile X Mental Retardation protein (FMRP) est la protéine absente dans le SXF. Elle régule la synthèse locale des protéines dans les neurites. Le bulbe olfactif du cerveau adulte est constamment alimenté de nouveaux neurones qui de par leur jeunesse sont extrêmement sensibles à l'influence de l'environnement et présentent des caractéristiques plastiques exceptionnelles par rapport aux autres neurones. Au cours de ma thèse je me suis penchée sur le rôle de FMRP et d'une de ses cibles traductionnelle,  $\alpha$ CamKII, dans cette plasticité extraordinaire.

## **Introduction**



## **1. La plasticité, à la base de l'apprentissage et de la mémoire**

### **1.1 Qu'est ce que la plasticité du cerveau?**

Tout animal est capable d'apprendre et de se souvenir de son expérience passée. Ceci est possible grâce à ce qu'on appelle la plasticité du cerveau. La plasticité peut être définie comme la capacité du cerveau à changer l'organisation de ses circuits neuronaux pour aboutir à un comportement adapté à l'environnement changeant. Ces changements d'organisation se produisent lors du développement normal du cerveau, pendant l'apprentissage et l'élaboration de la mémoire ou encore après des lésions neuronales. La plasticité est basée sur différents mécanismes cellulaires. La plasticité synaptique implique la modulation de la force des synapses préexistantes. La plasticité structurelle désigne la création ou l'élimination de synapses. Ces changements, qui se produisent tout au long de la vie, apportent alors une nouvelle connectivité entre les neurones et semblent être à la base de l'apprentissage et de la mémoire. De plus, la production de nouveaux neurones dans deux zones du cerveau adulte, le gyrus dentelé de l'hippocampe et le bulbe olfactif (BO) confère un fort degré de plasticité à ces deux régions. Je parlerai ici essentiellement de la plasticité structurelle et de la plasticité extrême apportée par la neurogénèse adulte car c'est à ces formes de plasticité que je me suis intéressée au cours de ma thèse.

### **1.2 La plasticité structurelle**

La connectivité du cerveau se modifie tout au long de la vie, via la création, la stabilisation et l'élimination de synapses. C'est ce qu'on appelle la plasticité structurelle (Caroni, Donato, & Muller, 2012). Elle se manifeste de différentes manières : i) via l'élimination ou création d'épines dendritiques et de boutons d'axones individuellement ; ii) Même si cela ne rentre pas dans le cadre de création ou élimination de synapses, on parle aussi de plasticité structurelle pour désigner des changements de morphologie des épines dendritiques qui se produisent en réponse à l'activité ; iii) via l'élimination ou la création de portions de dendrite. Dans cette

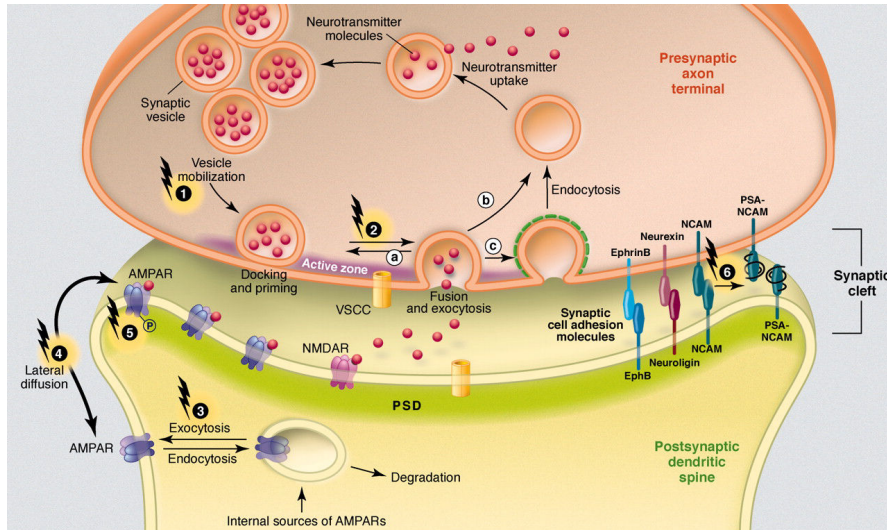


partie, j'énoncerai donc des exemples de ces différents phénomènes et leur importance dans la mémoire et l'apprentissage.

Dans un premier temps je présenterai brièvement la structure d'une synapse active. Puis j'exposerai les différentes modifications que la partie postsynaptique peut subir en réponse à l'activité.

#### i. La structure d'une synapse active

Une synapse excitatrice est composée d'une partie pré-synaptique, le bouton axonal, et d'une partie post-synaptique, l'épine dendritique. Les deux membranes sont séparées par un espace qu'on appelle fente synaptique. Le bouton axonal contient des vésicules synaptiques remplies de neurotransmetteurs. A l'arrivée d'un potentiel d'action dans le bouton axonal, certaines vésicules sont recrutées dans la zone active de la membrane pré-synaptique et fusionnent avec cette membrane pour expulser ces neurotransmetteurs par exocytose. Les neurotransmetteurs sont alors libérés dans la fente synaptique. La membrane de l'épine dendritique est caractérisée par la présence d'une densité postsynaptique (DPS) qui apparaît dense aux électrons sur les images de microscopie électronique. Elle est constituée de récepteurs aux neurotransmetteurs, de canaux ioniques et d'un réseau de nombreuses protéines d'échafaudage, qui ont pour rôle d'organiser cette membrane. Ces protéines structurent également la morphologie des épines. En effet, une densité postsynaptique importante est souvent associée à une tête d'épine large et une synapse stable (A. Holtmaat & Svoboda, 2009). Les épines dendritiques sont donc le lieu de réception de synapses excitatrices et c'est pourquoi elles sont tout particulièrement étudiées pour la compréhension des phénomènes d'apprentissage et de mémoire.



**Figure 1 : La synapse.** La partie orange représente le côté pré-synaptique, tandis que le côté vert représente le côté post-synaptique de la synapse. Du côté présynaptique, sont représentées des vésicules synaptiques contenant des neurotransmetteurs (billes roses). À l'arrivée d'un potentiel d'action, des vésicules sont recrutées à la membrane et fusionnent avec celle-ci pour libérer les neurotransmetteurs qu'elles contiennent dans la fente synaptique. Sur la membrane post-synaptique, des récepteurs aux neurotransmetteurs sont présents (en violet et rose). Sous la membrane, une bande verte plus foncée représente la densité post-synaptique (PSD). À droite du schéma, des molécules d'adhésion synaptique (bleues, rose, et vert) permettent de maintenir l'adhésion des 2 membranes. Extraite de (Ho, Lee, & Martin, 2011).

## ii. Elimination et création d'épines

Les épines dendritiques sont des structures hautement dynamiques. Elles apparaissent et disparaissent spontanément pendant le développement tardif du cerveau et ceci persiste à l'âge adulte, même si cette dynamique ralentit avec l'âge de l'animal (Holtmaat et al., 2005; Kasai et al., 2010; Trachtenberg et al., 2002). La majorité des études ont été réalisées dans le cortex et l'hippocampe, la dynamique des épines dans les autres régions du cerveau est donc beaucoup moins bien connue. L'imagerie 2-photons en time-lapse du cortex somato-sensoriel et du cortex visuel de la souris adulte a montré qu'une population d'épines apparaît et disparaît en quelques jours tandis qu'une autre population persiste pendant des mois. Cette population d'épines stables augmente avec l'âge de l'animal (Holtmaat et al., 2005). Ceci soutient l'idée que les épines stables sont les traces physiques de la mémoire de long terme (plus on est âgé, plus on a de souvenirs) (Xu et al., 2009; Yang, Pan, & Gan, 2009). Différentes manipulations permettent d'augmenter la densité d'épines, par exemple l'élevage des rats dans un environnement complexe augmente la densité d'épine dans le cortex visuel (Turner & Greenough, 1984). La stimulation

sensorielle des vibrisses augmente la densité d'épines dans le cortex somato-sensoriel des souris (Knott, Quairiaux, Genoud, & Welker, 2002; Trachtenberg et al., 2002). En ce qui concerne l'apprentissage, d'autres études ont montré qu'un enrichissement de l'environnement induit une augmentation de la densité d'épines dendritiques ce qui facilite l'acquisition de divers apprentissages. Par exemple, dans l'hippocampe un enrichissement de l'environnement augmente la densité d'épines dendritiques des neurones et améliore les performances lors d'un apprentissage de reconnaissance d'objet ou de conditionnement à la peur (Rampon et al., 2000). Une densité d'épines augmentée semble apporter un support à l'apprentissage et faciliter la mémorisation. Des effets directs de l'apprentissage sur la densité d'épines ont aussi été démontrés. Par exemple, lors d'un apprentissage spatial la densité d'épines est augmentée sur les dendrites des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe (Moser, Trommald, Egeland, & Andersen, 1997). Plus récemment, des études longitudinales réalisées par imagerie 2-photons montrent une augmentation de la densité d'épines après un apprentissage. Chez la souris, l'apprentissage moteur, qui nécessite un entraînement suivi, induit la formation de nombreuses nouvelles épines au cours de l'entraînement, puis la stabilisation d'une fractions d'entre elles (Xu et al., 2009; Yang et al., 2009). Chez le diamant mandarin juvénile, lors de l'écoute du chant du tuteur, il y a stabilisation, accumulation et élargissement des épines dendritiques des neurones du HVC (High Vocal Center), région du cerveau de l'oiseau nécessaire à l'apprentissage du chant (Roberts, Tschida, Klein, & Mooney, 2010). On peut donc penser que l'apprentissage stimule la dynamique des épines et sélectionne certaines épines pour les stabiliser. Elles semblent alors devenir les traces de l'apprentissage et support de la mémoire acquise.

### iii. Morphologie des épines

La plasticité structurelle des épines englobe également les changements de morphologie que les épines peuvent subir en réponse à l'activité. On peut observer plusieurs formes d'épine allant du fin filopode considéré comme immature, jusqu'à une forme de champignon, ou « mushroom », avec un cou très court et une large tête, considéré comme marque d'une synapse renforcée. Des études réalisées par microscopie électronique rapportent qu'il est difficile de classer toutes les épines par catégories reconnaissables et qu'elles forment plutôt un continuum entre le filopode

et le mushroom (Arellano, Benavides-Piccione, Defelipe, & Yuste, 2007). La morphologie des épines varie au cours du temps en fonction de l'activité (Trachtenberg et al., 2002; Van Harrevelde & Fifkova, 1975) et est déterminée par la taille de la densité postsynaptique. Plus la taille de la densité post-synaptique est importante, et plus le volume de la tête d'épine est important. Une étude a montré que la morphologie des épines dendritiques, la force de la synapse, et la longévité de la synapse sont corrélées (Caroni et al., 2012). Ceci s'explique par l'ajout de récepteurs de neurotransmetteurs et de protéines d'échafaudage dans la densité postsynaptique suite à des stimulations de haute fréquence de la synapse, qui alors grossit, c'est ce qu'on appelle la potentialisation à long terme ou Long Term Potentiation (LTP). La transmission nerveuse est alors facilitée au niveau de cette synapse. A l'inverse, une stimulation de basse fréquence induit le retrait de récepteurs de la densité postsynaptique, c'est la dépression à long terme ou long-term-depression (LTD). Cette corrélation a aussi été observée dans une étude réalisée à l'échelle d'épines individuelles, montrant que l'élargissement de la tête des épines dendritique est fortement lié au renforcement des synapses par LTP (Matsuzaki, Naoki, Ellis-Davies, & Kasai, 2004). Cette étude montre aussi que la LTP se produit préférentiellement dans les épines à petite tête, tandis qu'elle ne se produit que rarement dans les épines dont la tête est déjà large. Ceci suggère que les épines à larges têtes sont des supports de la mémoire de long terme puisque, de surcroît, elles persistent pendant plusieurs mois. La LTP induit un élargissement des épines et ceci induit une augmentation d'environ 30% de la force synaptique (Harris, Fiala, & Ostroff, 2003). À l'inverse, une forme de LTD dépendante des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR), induit un allongement des épines dendritique qui adoptent alors une morphologie plus proche du filopode (Vanderklish & Edelman, 2002). Enfin, une étude a récemment apporté un lien entre la taille des têtes d'épines et la mémoire. Dans cette étude, l'affinement de la tête des épines, induite par l'activation d'une forme photoactivable de Rac1, est accompagné de l'oubli de l'apprentissage moteur acquis par les souris (Hayashi-Takagi et al., 2015). Ceci suggère que les épines à large tête sont le support de la mémoire acquise lors de l'apprentissage moteur. Les épines à large tête sont donc bien une marque de synapses stables. Les critères morphologiques des épines dendritiques peuvent donc donner des indices fiables quant à la capacité de transmission de la synapse.

#### iv. Remodelages dendritiques

Bien que l'on ne connaisse pas la relation précise qu'il existe entre la fonctionnalité et la connectivité du réseau neuronal, on peut supposer que la plasticité structurelle dendritique est une trace solide de la mémoire de long-terme puisque la construction ou l'élimination de portions de neurites nécessite plus de temps que la modulation de la force d'une synapse préexistante. Cette forme de plasticité a pu être observée dans différentes régions du cerveau et à plus ou moins grande échelle. Les premières études étaient réalisées à l'aide du marquage de Golgi sur tissus fixés. Cette technique marque quelques neurones seulement de manière éparsée et aléatoire permettant l'observation de la morphologie des neurones. Ces études, rapportèrent des changements morphologiques des neurones corticaux drastiques dans le cerveau adulte, en réponse à des conditions d'élevage complexes (Volkmar & Greenough, 1972), à différents niveaux de stress (Magariños, McEwen, Flügge, & Fuchs, 1996), à l'apprentissage (Kolb, Cioe, & Comeau, 2008) ou encore à la consommation de drogue (Robinson, 1999). Par la suite est arrivée l'ère des marquages génétiques qui ont permis de marquer certains types de neurones de manière non aléatoire, ainsi que la microscopie multi-photons qui permet aujourd'hui de suivre les neurones d'un animal en vie sur une période prolongée. Ce type d'études a montré que les dendrites des neurones du cortex mature sont peu plastiques, même en réponse à un enrichissement ou un apprentissage. Plusieurs études longitudinales rapportent une grande stabilité des neurones pyramidaux présents dans différentes régions du cortex (Chow et al., 2009; Holtmaat et al., 2005; Lee et al., 2006; Trachtenberg et al., 2002). Seuls des neurones inhibiteurs semblent être capables de croissance dendritique mais n'excédant pas 1 à 5 % de la longueur dendritique totale (Lee et al., 2006; Lee et al., 2008). De même, dans le bulbe olfactif, les cellules mitrales et tufted-cells présentent une grande stabilité dendritique en réponse à enrichissement ou apprentissage olfactifs (Mizrahi & Katz, 2003). On peut en conclure que, contrairement à ce qui avait été suggéré par les études initiales utilisant la technique de Golgi, l'arborisation dendritique des neurones du cerveau adulte présentent une forte stabilité structurelle.

### 1.3 La neurogénèse adulte

Dans le cerveau adulte murin, deux zones principales sont restées neurogéniques : la zone subgranulaire du gyrus dentelé de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire (ZSV) qui produit des neuroblastes qui migrent jusqu'au BO pour s'y intégrer. Ceci confère un autre niveau de plasticité au cerveau adulte. Les neurones issus de la neurogénèse adulte sont particulièrement plastiques. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux cellules granulaires du BO, c'est pourquoi cette partie sera consacrée à la neurogénèse du BO. Dans cette section, je développerai donc les aspects plastiques des cellules granulaires qui représentent la majorité des neurones issus de la neurogénèse adulte dans le BO. Avant cela, je décrirai très brièvement la production des neuroblastes dans la ZSV ainsi que les étapes de différenciation et d'intégration des nouveaux neurones dans le BO.

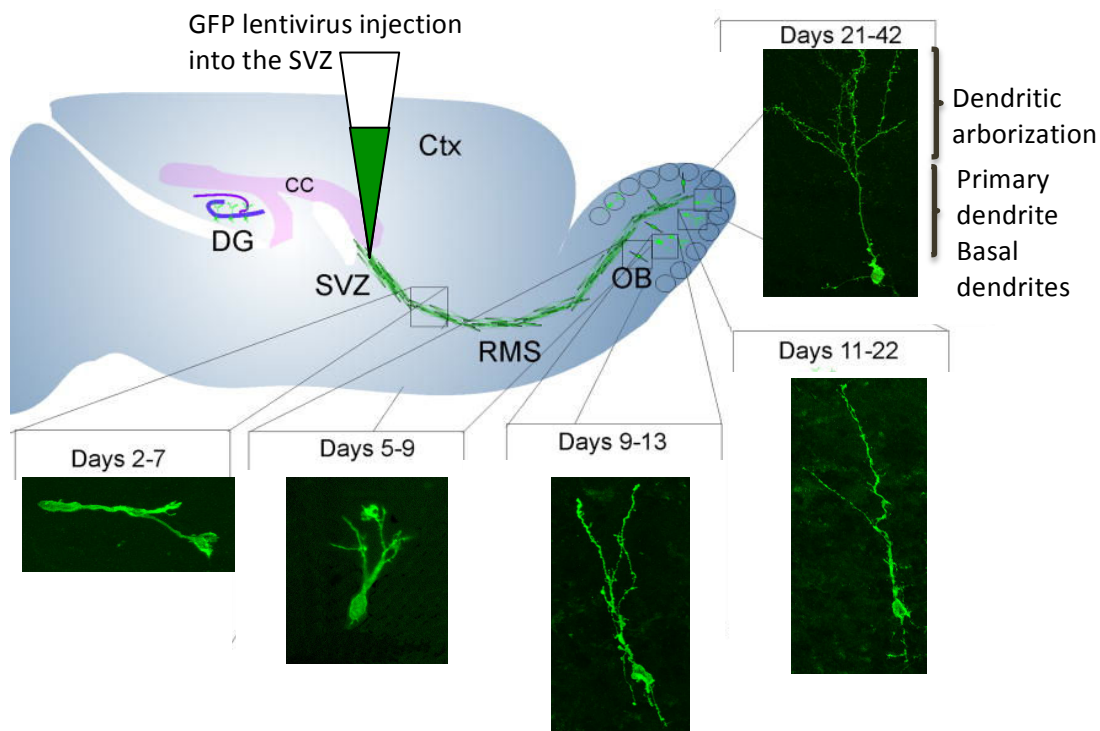
#### i. La production des nouveaux neurones dans la zone sous-ventriculaire (ZSV)

La ZSV est une des deux zones neurogéniques du cerveau adulte. Les cellules souches sont les cellules dites de type B qui sont de nature astrocytaire. Elles génèrent des progéniteurs, cellules de type C, qui se divisent activement. Ceux-ci donnent naissance aux jeunes neurones, types A. Ces jeunes neurones migrent ensuite, jusqu'au BO, en suivant le courant migratoire rostral (CMR). Dans le BO, ils s'intègrent et se différencient en interneurones GABAergiques (Doetsch, Caillé, Lim, García-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 1999).

#### ii. Différenciation et intégration synaptique des nouveaux neurones dans le BO

La neurogénèse adulte dans le BO produit majoritairement deux grands types de neurones, les cellules granulaires et les neurones périglomérulaires. Je ne parlerai que des cellules granulaires qui sont le type de neurones majoritairement produit (environ 95%). Grâce à l'injection par stéréotaxie de virus porteurs du gène de la GFP dans la ZSV, les différents stades de maturation des cellules granulaires ont pu être caractérisés de façon morphologique et électrophysiologique. Ainsi, cinq stades de maturation ont été décrits (Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002) (Fig. 2):

- Stade 1, 2-7 jours post injection (jpi): les neuroblastes migrent de manière tangentielle le long du CMR. Ils présentent une morphologie très simple avec un prolongement avant qui dirige la migration. Leurs propriétés membranaires sont similaires à celles des précurseurs neuronaux et ne présentent donc pas de courant post-synaptique.
- Stade 2, 5-9 jpi : les neuroblastes migrent de manière radiaire dans la couche de cellules granulaires du BO, et présentent toujours une morphologie très simple. Ils ne présentent toujours pas de courant post-synaptique.
- Stade 3, 9-13 jpi : les jeunes neurones ont arrêté leur migration et ont trouvé leur place dans la couche de cellules granulaires. Ils commencent à étendre une dendrite simple vers la couche des cellules mitrales. Du côté proximal, les premières synapses apparaissent sur les dendrites basales (Whitman & Greer, 2007) et on peut enregistrer des courant post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs, mais ils ne sont pas capables de produire de potentiels d'action.
- Stade 4, 11-22 : les cellules granulaires immatures présentent une arborisation dendritique plus complexe mais sans épines. Les plus matures commencent à avoir une activité pré-synaptique.
- Stade 5, 15-30 jpi : à terme, les cellules granulaires sont des interneurones GABAergiques, sans axones. À ce stade, elles présentent une arborisation dendritique complète recouverte d'épines et les jeunes neurones émettent des potentiels d'action de manière similaire aux autres neurones de la couche granulaire (Whitman & Greer, 2009). Ils forment des synapses GABAergiques avec les cellules mitrales entre 2 et 6 semaines après injection du virus dans le CMR (Bardy, Alonso, Bouthour, & Lledo, 2010).



**Figure 2: Les stades de maturation des nouveaux neurones du BO adulte.** Par injection dans la ZSV, d'un virus porteur du gène de la GFP, on peut visualiser tous les stades de maturation des nouveaux neurones du BO adulte. Ctx : cortex ; CC : corps calleux ; DG : gyrus dentelé ; SVZ : Zone sous-ventriculaire ; RMS : courant migratoire rostral ; OB : bulbe olfactif. Adaptée de (Whitman & Greer, 2009) et (Carleton, Petreanu, Lansford, Alvarez-Buylla, & Lledo, 2003).

### iii. La plasticité extraordinaire des nouveaux neurones

On appelle périodes critiques des fenêtres temporelles durant lesquelles les propriétés neuronales sont particulièrement sujettes aux modifications induites par l'activité. Lors des périodes critiques la plasticité synaptique et structurelle des neurones est particulièrement importante. L'olfaction est le seul sens (avec le goût) dont le développement ne traverse pas de période critique définie dans le temps. Les nouveaux neurones du BO, eux, traversent des périodes critiques pendant leur intégration. En effet, le développement des nouveaux neurones du cerveau adulte n'est pas uniquement défini par un programme intrinsèque. Le comportement de ces neurones est fortement influencé par leur âge et l'environnement olfactif. Étant donné qu'une grande quantité de neurones sont chaque jour intégrés dans le BO, on peut penser que les nouveaux neurones permettent de créer une période critique de développement du BO durant toute la vie de l'animal.



#### a. Les périodes critiques des nouveaux neurones

La survie des nouveaux neurones est déterminée par l'activité (Rocheffort, Gheusi, Vincent, & Lledo, 2002). Environ 50% des nouveaux neurones meurent entre 15 et 45 jours après leur naissance (Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002). Les cellules restantes peuvent survivre jusqu'à 1 an (Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002). Un enrichissement olfactif induit une augmentation du nombre de nouveaux neurones survivants (Rocheffort et al., 2002). À l'inverse, une privation olfactive induit une diminution de la survie des nouveaux neurones (Mandairon, Sacquet, Jourdan, & Didier, 2006). Cet effet est particulièrement visible lorsque la privation olfactive se déroule entre 14 et 28 jpi, alors que ces neurones s'intègrent et se différencient dans le BO (Yamaguchi & Mori, 2005).

Par ailleurs, alors que les nouveaux neurones s'intègrent dans le BO, on peut détecter une LTP au niveau des synapses glutamatergiques des dendrites basales. Cette plasticité qui disparaît avec le temps et n'est plus observable à 3 mois après injection (Nissant, Bardy, Katagiri, Murray, & Lledo, 2009). Ce caractère transitoire de la LTP montre que les jeunes neurones sont donc particulièrement sujets à la plasticité synaptique.

Le développement synaptique de ces neurones est régulé par l'activité. À partir de 28 jpi, lorsque les nouveaux neurones sont capables d'émettre des courants pré-synaptiques, une privation olfactive induit une altération du nombre de synapses sur la dendrite primaire et sur l'arborisation dendritique (Kelsch, Lin, Mosley, & Lois, 2009; Pallotto et al., 2012). Cette influence de l'activité sur la densité synaptique des nouveaux neurones est observable jusqu'à 56 jpi (Kelsch et al., 2009). L'activité olfactive permet donc de sculpter la connectivité des nouveaux neurones du BO pendant une période critique de 21 à 56 jours après leur naissance.

#### b. Les nouveaux neurones subissent des remodelages dendritiques de grande échelle

Dans le bulbe olfactif, Mizrahi (Mizrahi, 2007) a observé qu'une population des nouveaux neurones, les neurones périglomérulaires, mêmes matures, subissent des remodelage constants, tels qu'allongement ou rétractions de prolongements préexistants, mais aussi ajout de nouveaux branchements. Ces remodelages persistent même après intégration complète de ces neurones dans le réseau et résistent également à une privation sensorielle (Mizrahi, 2007). Les cellules

granulaires qui représentent 95% des neurones nouvellement générés dans le bulbe olfactif sont aussi capables d'une grande plasticité dendritique puisqu'une privation olfactive induit une diminution de la longueur de l'arborisation dendritique d'environ 50% (Scotto-Lomassese et al., 2011). On peut aussi observer des remodelages de ce type dans les nouveaux neurones du gyrus dentelé adulte. Un apprentissage spatial induit une complexification et un allongement de l'arborisation dendritique des neurones granulaires (Tronel et al., 2010). Cet allongement représente 50 à 100% de la longueur dendritique basale selon la difficulté de la tâche (Tronel et al., 2010). Les nouveaux neurones du cerveau adulte semblent donc partager des caractéristiques plastiques qui les singularisent par rapport aux neurones matures.

## **2. La traduction locale**

### **2.1 Qu'est ce que la traduction locale ?**

La traduction locale désigne la synthèse de protéines ayant lieu dans une région discrète de la cellule. Ceci implique le transport des ARNm et de la machinerie de traduction en dehors du corps cellulaire. Il existe de nombreux exemples de traduction locale, dont les premiers ont été découverts au milieu des années 80 dans différents types cellulaires et organismes. En effet, il s'agit d'un mécanisme conservé de la levure, aux cellules mammifères, en passant par la drosophile (Xing & Bassell, 2012).

### **2.2 Un rôle dans le développement axonal**

Pendant le développement du cerveau, un neurone étend son axone en suivant un chemin précis jusqu'à sa destination finale, guidé par des molécules extracellulaires, appelées signaux de guidage. Ces signaux sont perçus par le cône de croissance, structure motile et complexe au bout de l'axone en développement, grâce à une grande variété de récepteurs à la surface de sa membrane qui lui permettent de détecter spécifiquement ces signaux. Ces signaux sont ensuite intégrés et permettent des réarrangements du cytosquelette déterminant la direction et l'extension de l'axone. Dans cette partie, j'exposerai des expériences montrant que

la traduction locale possède un rôle dans le guidage des cônes de croissance et les ARNm traduits localement permettant ce guidage.

i. Mise en évidence

Les premières évidences de la traduction locale dans les axones viennent d'expériences de marquages métaboliques dans les axones en développement révélant la synthèse de nouvelles protéines (Giuditta, Dettbarn, & Brzin, 1968; Koenig, 1967). Des études réalisées en microscopie électronique à transmission (MET) sur des neurones en culture et chez l'embryon révèle la présence de polysomes libres au niveau des cônes de croissance (Bunge, 1973; Tennyson, 1970). Enfin, d'autres composants et organelles nécessaires à la synthèse protéique ont aussi été identifiés dans le cône de croissance, comme de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique (Merianda et al., 2009).

ii. La traduction locale permet aux cônes de croissance de répondre aux signaux de guidage

Des expériences réalisées *in vivo* chez le xénope, montrent que les axones des neurones dont les corps cellulaires se trouvent dans la rétine et qui se projettent dans le tectum sont capables de pousser et de suivre correctement les signaux trophiques alors que la rétine a été chirurgicalement retirée. Les auteurs font l'hypothèse, que les axones doivent contenir la machinerie nécessaire à la synthèse protéique permettant ce guidage (Harris, Holt, & Bonhoeffer, 1987). Le rôle de la traduction locale dans les cônes de croissance a ensuite été révélé par des études réalisées *in vitro*, où des inhibiteurs de la traduction appliqués sur des axones en développement isolés chirurgicalement de leur corps cellulaires rendaient les axones insensibles aux signaux de guidage (Campbell & Holt, 2001; K. Y. Wu et al., 2005; Yao, Sasaki, Wen, Bassell, & Zheng, 2006). De plus, on peut mesurer la synthèse protéique dans les axones en croissance séparés de leur soma via l'incorporation d'acides aminés marqués radio-activement. Les auteurs observent une rapide synthèse protéique suite à l'exposition à des signaux de guidage, la nétrine-1 et la sémaphorine-3A. Ceci est abolit en présence d'un inhibiteur de la traduction (Campbell & Holt, 2001). D'autres études réalisées avec d'autres signaux de guidage comme le BDNF, engrailed-1 et 2 et Slit montrent la même réaction ( voir Shigeoka,

Lu, & Holt, 2013). Tous ces résultats montrent l'importance de la traduction locale dans le guidage de l'axone en développement vers le territoire cible.

i. Les ARNm traduits dans les cônes de croissance

Le guidage du cône de croissance de l'axone est un processus complexe qui requiert de nombreuses protéines et niveaux de régulation. Le but de cette partie n'est pas de détailler les mécanismes permettant le guidage de l'axone, mais seulement de montrer à l'aide de deux exemples l'importance de la traduction locale dans ce processus.

a. Les protéines associées aux cytosquelette

L'ARNm de la  $\beta$ -actine a été le premier à être observé dans les cônes de croissance. Les auteurs observent par hybridation *in situ* que sa distribution n'est pas aléatoire et semble associée aux microtubules sous forme de granules distinctes qui co-localisent avec la machinerie de traduction (Bassell et al., 1998). Un gradient de BDNF, molécule de guidage attractive, induit la synthèse locale de la  $\beta$ -actine de manière asymétrique dans le cône de croissance, induisant un changement de direction vers la source de BDNF (Yao et al., 2006). De plus, l'inhibition de la traduction locale de  $\beta$ -actine empêche le changement de direction du cône de croissance vers les molécules de guidage attractives (Leung et al., 2006). Dans le cas de molécules répulsives, comme Slit2 ou Sémaphorine 3A (Sema3A), on observe, non pas un changement de direction vers la source de ces molécules, mais la disparition des filopodes et filaments qui permettent la progression du cône de croissance, c'est ce qu'on appelle la «catastrophe» (ou collapse). Une étude montre que dans ce cas, RhoA et cofiline, enzymes régulant la polymérisation de l'actine, sont rapidement synthétisées dans le cône de croissance. L'inhibition de cette synthèse abolit l'effet de catastrophe induit par Slit2 ou Sema3A (K. Y. Wu et al., 2005). Ces études *in vitro* montrent que la traduction locale de  $\beta$ -actine et des régulateurs de sa polymérisation permettent les réponses chémotropiques du cône de croissance via le (dés)assemblage polarisé du cytosquelette.

b. Les molécules d'adhésion

Un autre exemple montre que des molécules d'adhésion, comme la NF-protocadhérine (NFPC), exprimée par les neurones rétiniens chez le xénope est

aussi traduite dans le cône de croissance. À l'aide d'un rapporteur de traduction utilisé *in vivo*, les auteurs observent une synthèse rapide de NFPC dans le cône de croissance des neurones rétiniens. Ceci suggère que l'adhésion de l'axone à son substrat est permise par la traduction locale des molécules d'adhésion (Leung et al., 2013).

## 2.3 Un rôle dans la plasticité des neurones matures

Les neurones sont des cellules extrêmement polarisées. Les éléments pré et post-synaptiques peuvent se trouver à très grande distance du corps cellulaire. De plus, chaque synapse est différente. Chaque neurone possède 1 000 à 10 000 synapses, qui peuvent être modifiées indépendamment les unes des autres. Chaque épine dendritique est contactée par un axone qui n'est pas le même que celui contactant l'épine voisine. Une épine possède son propre protéome, avec ses récepteurs, ses canaux ioniques et les protéines associées, dont les quantités peuvent refléter l'histoire de la synapse. La traduction locale est apparue comme un moyen d'apporter les éléments nécessaires à l'établissement et au maintien de cette spécificité de chaque synapse.

### i. Mise en évidence de la présence de la machinerie de traduction et d'ARNm dans les dendrites

Le premier indice de l'existence de la traduction locale dans les dendrites date de 1982, lorsque Steward et Levy ont montré par MET la présence de polyribosomes au niveau des dendrites. Ils observent que ces polyribosomes sont organisés en rosettes, signe de traduction active. De plus, ces rosettes semblent spécifiquement être localisées à la base des épines dendritiques (Steward & Levy, 1982). Puis, des études ont montré la localisation spécifique de différents ARNm au niveau dendritique et axonal. Notamment, dans des cultures de neurones d'hippocampe, des hybridations *in situ* ont montré une localisation dendritique des ARNm codant pour des protéines dont la localisation est compartimentée dans la cellule, comme MAP2 (Microtubule Associated Protein 2). Cette étude suggère donc que certains ARNm sont sélectivement transportés et mis à disposition au niveaux des neurites pour être traduits localement (Kleiman, Banker, & Steward, 1990).

## ii. La traduction locale dendritique permet certaines formes de plasticité synaptique

Comme la LTP et la mémoire semblent partager les mêmes mécanismes cellulaires et moléculaires (Lynch, 2004), la LTP est devenue un modèle de mémoire. La forme de LTP la plus étudiée est dépendante des récepteurs NMDA (NMDAR). Elle se divise en deux phases : la LTP précoce, qui implique la modification de protéines préexistantes dans l'épine dendritique, et la LTP tardive qui nécessite une synthèse protéique et qui est inhibée par des inhibiteurs de la transcription, comme de la traduction (Costa-Mattioli & Sonenberg, 2008). La première preuve claire de la nécessité de la traduction locale pour induire une plasticité synaptique de long terme vient d'expériences réalisées sur des tranches d'hippocampe de rat : l'exposition au BDNF induit une LTP même lorsque les neurones pyramidaux sont sectionnés ce qui sépare les synapses du soma. Cet effet est bloqué en présence d'inhibiteurs de la traduction (Kang & Schuman, 1996). De plus, l'application d'inhibiteur de la traduction sur les dendrites inhibe la phase tardive de la LTP (Bradshaw, Emptage, & Bliss, 2003). D'autres formes de plasticités synaptiques ont aussi été liées à la traduction locale, comme la LTP et la LTD dépendantes des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) (Gélinas & Nguyen, 2005; Huber, Kayser, & Bear, 2000). Enfin, deux études *in vivo* chez la souris et la drosophile montrent l'importance de la traduction locale pour la LTP et la mémoire. La sous-unité  $\alpha$  de la Calcium-calmoduline-dependent-KinaseII ( $\alpha$ CamKII), impliquée dans la plasticité synaptique, est l'ARNm le plus abondant dans les dendrites. Des souris transgéniques dans lesquelles l'ARNm de  $\alpha$ CamKII est restreint au corps cellulaire, présente des défauts de plasticités synaptiques associés à des défauts d'apprentissage (Miller et al., 2002). Chez la drosophile, l'induction de mémoire à long-terme est associée à la localisation dendritique de l'ARNm de CamKII, où il est traduit (Ashraf, McLoon, Sclarsic, & Kunes, 2006).

## iii. Les ARNm traduits dans les dendrites

La recherche des protéines nouvellement synthétisées dans les dendrites a commencé à l'aide d'approches par candidats et l'observation des ARNm par hybridation *in situ*. Ainsi,  $\alpha$ CamKII (Burgin et al., 1990; Mayford, Baranes, Podsypanina, & Kandel, 1996) ; MAP 2 (Garner, Tucker, & Matus, 1988) ; Shank (Böckers et al., 2004),  $\beta$ -actine (Tiruchinapalli et al., 2003) ont été les premiers ARNm identifiés au niveau des dendrites. Puis des études à haut débit sur des puces d'ARNm ont permis d'identifier plusieurs dizaines d'ARNm candidats. Par exemples, une étude identifie 154 ARNm enrichis dans les dendrites de neurones de la région

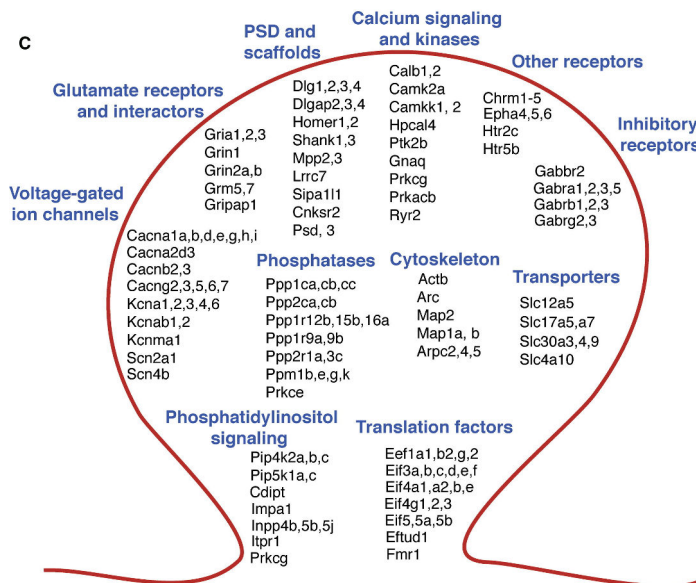
CA1 de l'hippocampe par rapport à leur corps cellulaires (Zhong, Zhang, & Bloch, 2006). Parmi ces ARNm, on retrouve certains identifiés par hybridation *in situ* comme  $\alpha$ CamKII, impliquée dans la plasticité synaptique et l'apprentissage (Miller et al., 2002) ou MAP2, protéine associée au cytosquelette. Enfin une étude réalisée en «deep sequencing» sur le même type de neurones révèle la présence de 2 550 ARNm différents dans les dendrites et axones (Cajigas et al., 2012). Cette méthode a permis de confirmer les ARNm déjà identifiés par les études énoncées précédemment, comme  $\alpha$ CamKII, ou encore Shank1, PSD95, Drebrin, Map1A etc... mais elle a surtout permis de révéler la présence d'ARNm très peu abondants comme SynGAP, Snap25, CyFIP2.

Ce nombre étonnamment élevé de 2 550 transcrits, s'il s'avère, suggère que la traduction locale dans les neurones n'est pas une exception mais plutôt une règle. Ceci suggérerait que la plupart des protéines présentes dans la synapse serait donc d'origine locale. D'ailleurs, les catégories listées dans le classement de ces ARNm couvrent la majorité des fonctions biologiques connues du neurone (Cajigas et al., 2012). En voici quelques unes : (pour une liste plus exhaustive voir figure 3)

- récepteurs aux neurotransmetteurs, canaux ioniques, récepteurs couplés aux protéines G
- protéines impliquées dans l'adhésion
- effecteurs des signaux intracellulaires dont l'activité enzymatique est induite par l'activité neuronale comme la PKA ou la protéine phosphatase 1 (PP1) qui régule l'activité des récepteurs AMPA et la force synaptique.
- régulateurs du trafic membranaire, utiles pour réguler le nombre de récepteurs sur la membrane post-synaptique, et des transporteurs intracellulaires comme la myosine.
- protéines responsables de modifications post-traductionnelles
- régulateurs de la traduction comme le facteur d'élongation eEF1A, plusieurs protéines de liaison aux ARN dont Pumilio qui régule la traduction du facteur d'élongation eIF4E
- protéines ribosomales.

Au regard de ces différentes catégories, on peut supposer que la traduction locale fournit les protéines nécessaires à la plasticité et à sa maintenance, mais aussi des protéines qui sont nécessaires à son propre maintien. La machinerie de traduction se construirait donc elle-même (au moins en partie), et apporterait les

éléments qui permettent sa régulation et les modification post-traductionnelles nécessaires au bon fonctionnement des protéines qu'elle génère (Zhong et al., 2006). Cependant des études plus approfondies sur chacun de ces ARNm candidats devront être réalisées afin de confirmer qu'ils sont bien traduits localement.



**Figure 3: les ARNm traduits au niveau des épines dendritique**

Adapté de (Cajigas et al., 2012)

## 2.4 Eléments de régulation

La traduction locale nécessite une régulation spatio-temporelle. Une traduction locale dérégulée peut, par exemple, entraîner une hyperexcitabilité neuronale, menant à des épilepsies ou des maladies psychiatriques comme le Syndrome de l'X Fragile. De nombreux acteurs permettent le contrôle de la traduction locale en réponse à l'activité synaptique. Parmi ces acteurs, on trouve des protéines de liaisons aux ARNm et différents types d'ARN non codants comme microARN, piwiARN, et petits ARN d'interférence sensibles à l'activité neuronale. Dans cette partie, je passerai en revue brièvement les éléments qui permettent le contrôle du transport des ARNm et la synthèse protéique sur leur site d'arrivée.

### i. Les 3'UTR, codes postaux vers les synapses



Les ARNm sont synthétisés dans le noyau, puis transportés dans le cytoplasme du corps cellulaire. Avant d'être traduits au niveau des synapses, ils doivent donc être transportés sur une longue distance pour atteindre leur lieu de traduction. L'arborisation des neurones peut être très complexe et atteindre jusqu'à quelques millimètres de longueur totale. Comment un ARNm peut-il atteindre son but ? Quels sont les signaux et transporteurs qui permettent un tel voyage ? Le premier élément qui permet ce transport est une étiquette contenue dans la séquence de l'ARNm qui indique qu'il doit être transporté en dehors du corps cellulaire pour être traduit. On appelle ces séquences des éléments *cis*. La plupart des éléments régulateurs *cis* se situent dans les régions non traduites (UnTranslated Regions ; UTR) des ARNm en 5' et en 3', mais peuvent aussi être présents dans la séquence codante (Di Liegro, Schiera, & Di Liegro, 2014). Le plus souvent, ces éléments sont présents dans le 3'UTR. Différentes études montrent l'importance des séquences 3'UTR dans la localisation dendritique ou axonale de  $\alpha$ CamKII (Mayford et al., 1996), Shank1 (Böckers et al., 2004), Arc (Kobayashi, Yamamoto, Maruo, & Murakami, 2005), etc... (Voir table1 pour une liste plus exhaustive). Ces différents éléments *cis* peuvent être des séquences de nucléotides ou bien des structures secondaires adoptées par la séquence (Di Liegro et al., 2014). Le 3'UTR de  $\beta$ -actine contient une séquence primaire de 54 nucléotides riche en A (adénosine) et C (cytosine) permettant son transport (Hüttelmaier et al., 2005). Le 3'UTR de  $\alpha$ CamKII contient une séquence appelée Cytoplasmic Polyadenylation Element (CPE) (Huang, Carson, Barbarese, & Richter, 2003). Des séquences primaires variables, très riche en G (guanosine), formant une structure secondaire particulière appelée G-quartet ou G-quadruplex, sont présentes dans de nombreux ARNm dendritiques dont  $\alpha$ CamKII et PSD95 (Subramanian et al., 2011). Les éléments *cis* peuvent être multiples et/ou redondants sur le même ARNm. L'ARNm de  $\alpha$ CamKII contient 4 séquences qui participent à sa localisation dendritique : le CPE, le G-quartet, une séquence de 94 nucléotides au début du 3'UTR (Mori, Imaizumi, Katayama, Yoneda, & Tohyama, 2000) et une séquence de 1200 nucléotides dans le 3'UTR également (Blichenberg et al., 2001). Ces multiples étiquettes participent à la diversité des éléments *cis* et permettent certainement la spécificité de reconnaissance et de localisation des ARNm (Thomas, Pascual, Maschi, Luchelli, & Boccaccio, 2014). L'épissage alternatif au niveau du 3'UTR de certains ARNm, comme celui du BDNF, permet différentes localisations subcellulaires (Baj, Leone, Chao, & Tongiorgi, 2011). Le transport des ARNm est

aussi influencé par l'editing. Par exemple, épissage et editing de l'ARNm des récepteurs AMPA permettent de produire différents transcrits qui ne sont pas localisés de la même manière dans les neurones (La Via et al., 2013).

**Table 1. List of mRNAs whose localization elements (LE) have been characterized in neurons**

Transcript	Organism	Subcellular location	LE position	Minimum LE length	Reference	Binding protein(s)	Reference
<i>βactin</i>	rat	Dendritic filopodia	3'UTR	54 nt	[94]	ZBP-1	[94]
<i>Arc</i>	rat	dendrites	3'UTR	350nt (strong) 370 (weak)	[95]		
<i>BDNF</i>	mouse, rat	Dendrites	3'UTR		[55]		
<i>αCamKII</i>	rat	Dendrites	3'UTR	1200 nt, 30 nt CPE	[96] [97]	CPEB	[109]
<i>dendrin</i>	rat	Dendrites	3'UTR	1000nt	[98]		
<i>IP3RI</i>	mouse	Dendrites	3'UTR		[99]	Hfz	[99]
<i>MAP2</i>	rat	Dendrites	3'UTR	640 nt	[100]	MARTA1 and 2	[110]
<i>nanos</i>	<i>Drosophila</i>	Dendrites	3'UTR		[101]		
<i>neurogranin</i>	rat	Dendrites	3'UTR	30 nt	[97]		
<i>NMDA receptor subunit NR1</i>	rat	Dendrites	5'UTR	24 nt	[102]	60 and 70 KDa proteins	[102]
<i>Protein kinase M<sub>1</sub></i>	rat	Dendrites	3'UTR	84 nt	[103]		
<i>RhoA</i>	rat	Axons	3'UTR		[104]		
<i>Shank1</i>	rat	Dendrites	3'UTR	200nt	[105]		
<i>syntaxin</i>	<i>Aplysia</i>	Axon hillock	3'UTR	CPE	[106]	CPEB	[106]
<i>tau</i>	rat	Axons	3'UTR	91 nt	[107]	Ilf3 and NF90	[111]
<i>vasopressin</i>	rat	Dendrites	ORF+3'UTR		[108]	PABP	[112]

When known, LE binding proteins are also indicated.

*BDNF* = brain-derived nerve factor mRNA.

*αCamKII* = calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha mRNA.

*IP3RI* = type1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mRNA.

*MAP2* = microtubule associated protein 2 mRNA.

CPE, PABP, CPEB = see Box 3.

nt = nucleotides.

**Table 1 : les ARNm traduit localement et leur séquences de localisation extra-somatique.** Tiré de Andreassi & Riccio, 2009.

## ii. Les éléments *trans*.

Les éléments cis sont variables d'un ARNm à l'autre, mais tous ont pour caractéristique de recruter des protéines de liaison aux ARNm (RNA Binding Protein, RBP). Ces RBP peuvent s'associer à d'autres partenaires protéiques ou des ARN non codants qui agissent ensemble comme des éléments *trans* pour permettre le transport et le contrôle de la traduction des ARNm dans les dendrites en réponse à l'activité neuronale. Les mécanismes d'action de ces RBP et ARN non codants sont extrêmement variés, et chaque RBP influe sur la traduction locale à différents niveaux. Le but de cette partie n'est pas d'énumérer tous les mécanismes mais de donner un aperçu des différentes possibilités à disposition au niveau des synapses pour contrôler la synthèse protéique synaptique.

### a. Les RNA Binding Proteins

Certaines RBP s'attachent aux ARNm afin de les emporter vers leur site de traduction, où elles régulent leur traduction par différents moyens. De nombreuses RBP impliquées dans la plasticité neuronale ont été identifiées. Les plus étudiées

sont ZBP (Zipcode Binding Protein), FMRP, CPEB (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein), hnRNPA2 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteine A2) et les protéines Staufen. Chacune possède ses sites de liaisons sur les 3'UTR des ARNm. Zipcode Binding Protein 1 (ZBP 1), se lie spécifiquement à la séquence de 54 nucléotides, riche en AC du 3'UTR de  $\beta$ -actine. CPE Binding protein (CPEB) se lie au CPE (Huang et al., 2003). La Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) se lie à différentes structures secondaires comme les G-quartets (Schaeffer et al., 2001), SoSLIP (Bechara et al., 2009) et les kissing complex (Darnell et al., 2005). Staufen2 reconnaît également une structure secondaire. Certaines RBP assurent le transport des ARNm en formant des granules dans lesquelles elles répriment la traduction de façon à éviter toute synthèse ectopique. Elles peuvent être des inhibiteurs de la traduction, qui en réponse à l'activité, lèvent l'inhibition qu'elles exercent sur l'ARNm. D'autres, au contraire, sont recrutées pour stimuler la traduction. Elles peuvent, pour ce faire jouer sur différentes étapes entre l'acheminement des granules et le signal qui permettra la traduction :

- L'initiation

ZBP1 empêche l'association des deux sous unités des ribosomes (Kiebler & Bassell, 2006). FMRP inhibe aussi l'initiation en recrutant CyFIP pour empêcher la formation du complexe d'élongation (Napoli et al., 2008).

- L'élongation de la traduction

Elles peuvent interagir avec les complexes d'initiation de d'élongation de la traduction ou bien directement avec les ARNm, ou encore en aidant l'action des microARN. Par exemple FMRP interagit avec mir 125a (Muddashetty et al., 2011) pour empêcher la traduction locale de PSD95, mais est aussi capable d'empêcher la progression des ribosomes en se liant à l'ARNm (Darnell et al., 2011). Plus récemment, il a été montré que FMRP se lie à la sous-unité 80S des ribosomes pour empêcher la liaison des ARNt (Chen, Sharma, Shi, Agrawal, & Joseph, 2014).

- La polyadénylation des ARNm

CPEB régule la longueur de la queue polyA. En réponse à une stimulation des NMDAR, CPEB induit un allongement de la queue polyA de nombreux ARNm, dont NR2A et  $\alpha$ CamKII, ce qui stimule la traduction (Udagawa et al., 2012).

## b. Les ARN non codants

Les microARN sont des inhibiteurs de la traduction de manière générale. Ce sont des molécules d'ARN simple brin de 19 à 23 nucléotides, dont la séquence s'hybride de manière complémentaire à l'ARNm cible pour inhiber sa traduction à l'aide d'un complexe protéique, le miRNA-induced-silencing-complex (miRISC). Ces miR sont aussi présents au niveau des synapses, et de nombreux ARNm post-synaptiques sont régulés par les microARN (Muddashetty et al., 2011). Ils jouent sur la traduction à plusieurs niveaux :

- miRISC recruté par le mir sur l'ARNm inhibe l'élongation de la traduction. Cette inhibition est levée en réponse à l'activité grâce à une nucléase activée par la stimulation (Siegel, Saba, & Schratt, 2011).
- ils peuvent induire la déadénylation et le retrait de la coiffe des ARNm ce qui engendre leur dégradation (Djuranovic, Nahvi, & Green, 2012)
- le complexe miRISC est présent au niveau des Processing Bodies (PB) qui sont des granules non motiles situées près des synapses et dans lesquelles la traduction est réprimée et la machinerie de dégradation des ARNm est présente.

La production des microARN est régulée par l'activité. L'enzyme DICER qui clive les pre-microARN pour générer les mir matures est présente au niveau de la densité post-synaptique et est activée en réponse à l'activité synaptique (Siegel et al., 2011).

D'autres types d'ARN non codants, comme les piwiARN et les siARN ont été détectés au niveau des dendrites mais leur rôle dans la traduction locale n'a pas encore été élucidé (Thomas et al., 2014).

### iii. Les granules de transport

Les ARNm et les RBP forment des complexes ARNm/protéines appelés mRNP qui sont détectés sous formes de granules qui contiennent également des ribosomes, des protéines ribosomales, et des facteurs d'élongation de la traduction (Knowles et al., 1996). La composition précise de ces granules reste encore à préciser, et cette composition varie probablement d'une granule à l'autre. On ne sait d'ailleurs toujours pas vraiment si les mRNP contiennent chacune un seul type d'ARNm (et en combien de copie(s)), ou bien si elles en contiennent plusieurs différents. Une étude indique qu'il s'agirait d'un transport commun des différents ARNm (Gao, Tatavarty, Korza, K., & Carson, 2008). De récentes études quantitatives d'imagerie à l'échelle d'une seule molécule suggèrent plutôt le transport d'une seule copie d'ARNm dans une granule (Xing & Bassell, 2012). Le transport de ces mRNP est assuré par les moteurs

moléculaires, dynéine et kinesine, associées aux microtubules, ainsi que la myosine associée au réseau de microfilaments d'actine (Xing & Bassell, 2012). Les RBP pourraient servir d'adaptateurs entre les ARNm et les moteurs moléculaires. Cela a été démontré pour les granules contenant FMRP, dans lesquelles la partie C terminale (C-ter) de FMRP interagit avec la kinésine pour permettre le transport (Dictenberg, Swanger, Antar, Singer, & Bassell, 2008). Pendant le transport, les ARNm sont maintenus silencieux. En effet, les granules contiennent des répresseurs de la traduction, comme la maskin (Huang et al., 2003), ou encore FMRP qui selon son état de phosphorylation, inhibe ou permet la traduction (Laggerbauer, Ostareck, Keidel, Ostareck-Lederer, & Fischer, 2001). De même, la protéine RNG105, inhibiteur de la traduction, est aussi retrouvée dans les granules de transport (Shiina, Shinkura, & Tokunaga, 2005). Une dépolarisation du neurone induit la translocation des ARNm vers les polysomes libres, permettant ainsi la traduction (Krichevsky & Kosik, 2001).

#### iv. Régulation de du transport et de la traduction par l'activité

##### a. Régulation du transport par l'activité

La traduction locale nécessite le transport des ARNm vers les synapses activées. Il existe de nombreux exemples d'induction du transport d'ARNm en réponse à l'activité, comme pour les ARNm de FMRP, (Antar, Afroz, Dictenberg, Carroll, & Bassell, 2004), Arc (Oswald Steward et al., 1998),  $\alpha$ CamKII (Rook, Lu, & Kosik, 2000),  $\beta$ -actine (Tiruchinapalli et al., 2003), GluR1 et GluR2 (Smith, Starck, Roberts, & Schuman, 2005). En revanche les mécanismes permettant le recrutement des ARNm vers les synapses sont peu compris. Des études suggèrent l'implication de la voie des MAP kinases dans le transport de Arc, de  $\alpha$ CamKII et de Staufen2 suite à une dépolarisation (Swanger & Bassell, 2013). Le ciblage des ARNm dans les neurites reste aussi mystérieux (Buxbaum, Yoon, Singer, & Park, 2015). Le transport des ARNm est-il biaisé ou non vers des branches spécifiques de l'arborisation dendritique ? Les études d'imagerie réalisée à l'échelle d'une seule molécule d'ARNm indiquent des comportements de va-et-vient des ARNm (Buxbaum et al., 2015). Ceci conduit à l'émergence d'un modèle selon lequel les ARNm navigueraient au hasard le long des neurites, et seraient capturés au niveau des sites de

stimulation (Buxbaum et al., 2015), un modèle appelé par certains le modèle «convoyeur de sushi» ou «sushi belt» (Doyle & Kiebler, 2011).

#### b. Régulation de la synthèse protéique par l'activité

L'activité neuronale régule la traduction via différents mécanismes dont certains agissent sur l'initiation, d'autres sur l'élongation de la traduction.

Contrôle de la traduction locale par l'activité lors de l'initiation :

L'activité peut jouer sur le recrutement des ribosomes sur le 5'UTR des ARNm via la phosphorylation des facteurs d'initiation de la traduction ou bien sur la longueur de la queue polyA des ARNm. La phosphorylation de eIF2 $\alpha$  inhibe la traduction locale de manière générale, mais permet la traduction locale d'une sous-population d'ARNm. L'application de BDNF, de forskoline, des stimulations synaptiques répétées ou encore l'apprentissage induisent une diminution de la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  (Costa-Mattioli, Sossin, Klann, & Sonenberg, 2009). La diminution de la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  a été impliquée dans l'établissement de la L-LTP, la mémoire spatiale et gustative de long-terme et dans un paradigme de mémoire de la peur contextuelle (Buffington, Huang, & Costa-Mattioli, 2014). La phosphorylation eIF2 $\alpha$  pourrait avoir des effets différents sur les neurones glutamatergiques et GABAergiques. Par exemple, une augmentation de la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  dans les neurones glutamatergiques augmente la traduction de ATF4. ATF4 inhibe alors l'activité du facteur de transcription CREB (c-AMP Response Element Binding Protein) observée lors de la LTP ou lors de la formation de la mémoire à long-terme (Buffington et al., 2014). Dans les neurones GABAergiques, une augmentation de la phosphorylation eIF2 $\alpha$  augmente la transmission de GABA et diminue l'excitabilité du réseau neuronal (Buffington et al., 2014).

Le complexe mTORC1 (mechanistic Target of Rapamycin Complex 1) permet aussi la régulation de la traduction via la phosphorylation de ses cibles qui sont impliquées dans l'assemblage du complexe d'initiation de la traduction. L'activité de mTORC1 est stimulée par la voie de signalisation PI3K/Akt induite par l'activité synaptique. mTORC1 a pour cible les 4E-BPs (eIF4E Binding Proteins) et les S6 kinases (S6K). L'activité de mTORC1 inhibe l'action des 4E-BPs qui contrôlent la traduction locale en empêchant l'assemblage du complexe d'initiation de la traduction eIF4F (Takei, 2001). mTOR contrôlerait la traduction locale aussi via la

phosphorylation des S6K. Ces kinases phosphorylent eIF4B et la protéine ribosomale S6 ce qui active la traduction dépendante de la coiffe, et l'assemblage des ribosomes respectivement (Buffington et al., 2014). La rapamycine inhibe l'activité de mTORC1. L'application de rapamycine sur tranches d'hippocampe de souris inhibe la L-LTP (Cammalleri et al., 2003). Des études comportementales montrent que l'activité de mTORC1 est nécessaire à la formation de la mémoire à long-terme (Bekinschtein et al., 2007).

L'activité traductionnelle dépend aussi de la longueur de la queue polyA des ARNm. CPEB régule la traduction locale d'ARNm spécifiques. Elle agit dans les dendrites à l'aide de ses partenaires : la polyA polymérase Gld2, la déadénylase PARN et l'inhibiteur de la traduction neuroguidin (Ngd). L'action de ce complexe dépend de l'activité neuronale. L'activation des NMDAR induit la phosphorylation de CPEB par la protéine Aurora, PARN est alors libéré et Gld2 peut amplifier la queue polyA de l'ARNm. La PolyA Binding Protein (PAPB) se lie alors à l'ARNm et recrute le facteur d'initiation eIF4F sur le 5'UTR (Huang, Jung, Sarkissian, & Richter, 2002). Les souris CPEB1 KO présentent des défauts de synthèse protéique induite par la LTP associés à une extinction réduite de l'apprentissage spatial et la mémoire associée à la peur (Buffington et al., 2014). À l'inverse, la LTP est facilitée par la déplétion de Ngd (Udagawa et al., 2012). La PAPB interacting Protein 2 (Paip2) contrôle l'activité de la PAPB et joue aussi un rôle dans la régulation de la traduction. Elle peut empêcher la liaison de PAPB sur l'ARNm ou peut entrer en compétition avec eIF4G pour lier PAPB (Buffington et al., 2014). Une entrée de  $Ca^{2+}$  active les calpaines qui entraînent alors la dégradation de Paip 2 (Khoutorsky et al., 2013).

Contrôle de la traduction locale par l'activité lors de l'élongation :

eEF2 se lie aux ribosomes pour stimuler l'élongation de la traduction. L'activité du facteur d'élongation eEF2 est inhibée par sa phosphorylation par la kinase eEF2K. eEF2K est activée par l'entrée de  $Ca^{2+}$ . L'activation des récepteurs AMPA, NMDA et mGluR1/5 induisent la phosphorylation de eEF2 (Taha, Gildish, Gal-Ben-Ari, & Rosenblum, 2013). La phosphorylation de eEF2 stimule la traduction de certains ARNm comme Map1B ou Arc. Lors de la mGluR-LTD, quand eEF2 est phosphorylé, la traduction locale de Map1B et Arc est augmentée. La diminution de l'expression de eEF2K empêche l'augmentation de la traduction de Map1B et Arc et des défauts de LTD (Buffington et al., 2014)

FMRP est aussi un régulateur clé de la traduction locale induite par l'activité.

### 3. La Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP)

FMRP est une protéine qui a été beaucoup étudiée depuis les années 90, d'abord car il s'agit de la protéine absente chez les patients atteints du Syndrome de l'X Fragile (SXF), une déficience intellectuelle héréditaire très répandue. En 1991, le clonage du gène *FMR1* qui code pour FMRP, a révélé un mécanisme de mutation étonnant (Vries, Halley, Oostra, & Niermeijer, 1998). Il s'agit d'une mutation instable sous forme d'une expansion du triplet CGG, d'au moins 200 copies dans le 5'UTR. Le clonage a aussi permis d'établir un test fiable pour le diagnostic du SXF. Par la suite la volonté de comprendre la maladie et de traiter ces patients à amené les chercheurs à tenter de comprendre son rôle dans le transport et la traduction locale des ARNm dans le cerveau, et donc dans le développement et la plasticité du système nerveux. Dans cette partie, je présenterai FMRP en insistant sur son rôle central dans le contrôle de la traduction locale permettant le développement et la plasticité des neurones.

#### 3.1 Le syndrome de l'X Fragile (SXF)

Le SXF est la forme de déficience intellectuelle héréditaire monogénique la plus répandue dans la population. Son nom vient de l'observation d'une zone claire, ressemblant à une zone de « fragilité » sur l'extrémité du bras long du chromosome X chez les patients atteints de ce syndrome. La répétition du triplets CGG en plus de 200 copies en amont du gène *FMR1* induit une hyperméthylation du promoteur, le rendant alors silencieux et menant ainsi à l'absence de la protéine et aux symptômes associés (Bassell & Warren, 2008). Dans cette partie, je présenterai brièvement les symptômes observés chez les patients SXF puis développerai les caractéristiques comportementales observées chez les modèles animaux qui ont été élaborés et qui ont permis de comprendre les origines cellulaires et moléculaires de la pathologie.

##### i. Les symptômes

Le SXF se caractérise par une déficience intellectuelle modérée à sévère, hyperactivité, hypersensibilité sensorielle, ainsi que des troubles du spectre autistique dont anxiété sociale et stéréotypies (Kaufmann & Reiss, 1999; Oddi,



Crusio, D'Amato, & Pietropaolo, 2013). Ces troubles cognitifs peuvent également être associés à différentes caractéristiques physiques tels qu'un visage allongé, mâchoire et front proéminents, des oreilles larges et décollées, macro-orchidie, etc...(Kaufmann & Reiss, 1999; Oddi et al., 2013). Les déficits neurologiques étant les caractéristiques les plus importantes de la pathologie, dans un premier temps les études se sont concentré sur l'analyse de cerveaux post-mortem. Ces études ont notamment révélé une morphologie anormale des épines dendritiques au niveau des neurones néocorticaux des patients. Les épines sont longues et tortueuses, signe d'immaturité (Hinton et al., 1991), caractéristique qui sera considérée comme la signature de la maladie.

## ii. Les modèles animaux du SXF

Par la suite, un modèle murin de la maladie a été généré, les souris *Fmr1* KO (Bakker et al., 1994), permettant encore aujourd'hui d'étudier la physiopathologie du SXF. De même que les patients atteints du SXF, ces souris présentent une macro-orchidie, de l'hyperactivité, des déficits d'apprentissage, des stéréotypies (Oddi et al., 2013), ainsi que les mêmes défauts de maturation des épines dendritiques qui apparaissent longues, fines et en plus grande densité (Comery et al., 1997). L'identification d'un homologue de FMRP chez la drosophile, *dfmrp*, (Wan, Dockendorff, & Jongens, 2000), puis la génération d'un mutant dépourvu du gène *dfmr1* (Zhang et al., 2001) a aussi participé à la compréhension du rôle de FMRP dans le cerveau. Dans cette partie, je présenterai des défauts d'apprentissage et comportementaux observés chez les souris *Fmr1* KO et la drosophile *dfmr1*.

### a. Chez la souris

#### Des défauts d'apprentissage spatial

Chez les souris *Fmr1* KO, les défauts d'apprentissage spatial sont relativement modérés. Selon les études, les souris présentent des défauts subtiles ou pas de défaut du tout (Santos, Kanellopoulos, & Bagni, 2014). En revanche les souris *Fmr1* KO ont clairement plus de mal à apprendre une nouvelle information spatiale, une fois qu'elle en ont intégré une première (Bhattacharya et al., 2012). Ceci souligne le manque de flexibilité du comportement des souris *Fmr1* KO, trait caractéristique des patients atteints du SXF.

#### Des défauts d'apprentissage associatif

Encore une fois, selon les études, les performances comportementales des souris *Fmr1* KO varient. En revanche, des défauts de conditionnement à la peur soulignant des déficits de mémoire ont été détectés (Santos et al., 2014). Les souris *Fmr1* KO semblent pouvoir associer un lieu à un stimulus désagréable aussi bien que des souris sauvages. Par contre, l'extinction de cette association, qui nécessite une synthèse protéique dans l'hippocampe est exagérée chez ces souris (Dölen et al., 2007). Les souris *Fmr1* KO sont capables d'associer un signal lumineux à une récompense alimentaire, cependant elles ont besoin de plus de temps que les souris sauvages (Krueger, Osterweil, Chen, Tye, & Bear, 2011). Elles ne présentent aucun défaut de discrimination olfactive, comme attesté par plusieurs études (Schilit Nitenson et al., 2015).

#### Des défauts d'interaction sociale

Les troubles de l'interaction sociale sont également un trait caractéristique des patients atteint du SXF, c'est pourquoi des études ont analysé le comportement social de ces souris. Lors de tests d'interaction sociale, les souris *Fmr1* KO n'ont pas de problèmes de préférence sociale, c'est à dire qu'elles vont passer plus de temps avec une autre souris qu'avec un objet. En revanche elle semblent ne pas différencier une souris familière d'une souris étrangère (Bhattacharya et al., 2012). Elles présentent également une anxiété sociale associée à des déficits de dominance (Santos et al., 2014).

Les souris *Fmr1* KO présentent aussi d'autres caractéristiques comparables au SXF humain comme une hypersensibilité sensorielle pouvant mener à des crises épileptiques audiogènes.

#### b. Chez la drosophile

Le paradigme d'apprentissage le plus utilisé pour tester la mémoire et l'apprentissage chez les mouches, est l'apprentissage associatif. Les mouches doivent apprendre à associer une odeur à un choc électrique. Les mouches *dfmr1* présentent un déficit robuste lors de cette tâche, ce qui montre un déficit de la mémoire de long-terme (Coffee et al., 2012).

FMRP est nécessaire à différents types d'apprentissage et comportements sociaux. L'apprentissage, la formation de la mémoire et la flexibilité du comportement sont permis grâce à la plasticité neuronale. Dans cette partie, je présenterai le rôle

de FMRP dans le développement et la plasticité des neurones en tant que protéine régulant la traduction locale d'ARNm cibles.

### 3.2 Structure et expression de FMRP

#### i. Structure de FMRP

FMRP est une protéine de 71 kDa qui possède deux domaines KH et une RGG box qui lui permettent de se lier à des ARNm (Bassell & Warren, 2008). La partie C terminale (C-ter) de FMRP contenant la RGG box permet la liaison aux G-quartets (Schaeffer et al., 2001) et à SoSLIP (Bechara et al., 2009), structures secondaires adoptées par des ARNm. Les domaines KH permettent la liaison de FMRP à la sous-unités 80S des ribosomes (Chen et al., 2014), et aux kissing loops (Darnell et al., 2005). Elle possède aussi un signal de localisation nucléaire (SLN) ainsi qu'un signal d'export nucléaire (SEN) (Feng et al., 1997) (Fig 4).

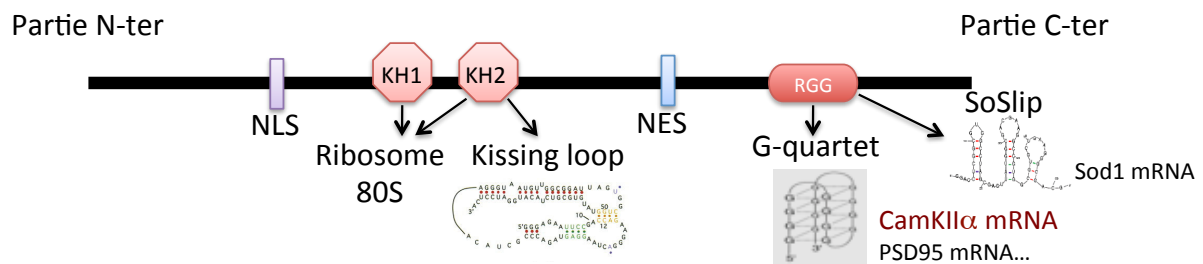


Figure 4 : **Structure de FMRP.** NLS : signal de localisation nucléaire. NES : signal d'export nucléaire.

#### ii. L'expression de FMRP est sensible à l'activité neuronale

FMRP est exprimée dans toutes les régions du cerveau, en développement et à l'âge adulte, dans les neurones majoritairement (Christie, Akins, Schwob, & Fallon, 2009). Au niveau subcellulaire, elle est présente dans le noyau, le soma, dans les dendrites, les épines dendritiques (Feng et al., 1997) et dans les axones (Christie et al., 2009). Dans les dendrites, FMRP est présente dans les complexes ribonucléiques associés à la machinerie de traduction (Khandjian et al., 2004). De même, dans les neurones sensoriels olfactifs, FMRP est présente dans des granules, détectées par immunohistochimie sous forme de points immunoréactifs pour FMRP, localisés au niveau présynaptique (Christie et al., 2009).

Dans des préparations de synaptoneurosomes, une stimulation par le DHPG (3,5-Dihydroxyphenylglycine) induit l'association de l'ARNm FMR1 aux polyribosomes

actifs et la quantité de FMRP est augmentée (Weiler et al., 1997). Ceci suggère que l'activité neuronale augmente la traduction locale de FMRP. Plusieurs expériences *in vivo* démontrent également une augmentation de l'expression de FMRP en réponse à l'apprentissage ou à des stimulations sensorielles. Par exemple, le niveau d'expression de FMRP est augmenté suite à l'apprentissage ou à l'exposition à un environnement complexe (Irwin et al., 2000). Le niveau de FMRP est aussi augmenté dans le cortex somato-sensoriel en réponse à une stimulation des vibrisses (Todd & Mack, 2000; Todd, Malter, & Mack, 2003). Des études menées par un autre laboratoire ont montré que le niveau de FMRP est aussi augmenté dans les corps cellulaires et au niveau des dendrites du cortex visuel de rats élevés dans le noir et soudainement exposés à la lumière (Gabel et al., 2004). Cette augmentation de l'expression de FMRP dépend de l'activation de différents récepteurs aux neurotransmetteurs : les récepteurs mGluR de groupe 1 et des NMDAR (Gabel et al., 2004; Todd & Mack, 2000; Todd et al., 2003). Cette régulation de l'expression de FMRP par l'activité résulte d'une activation de la traduction, puisque la quantité d'ARNm reste constante (Gabel et al., 2004).

L'expression de FMRP est donc régulée par l'activité ce qui suggère son importance pendant les phases d'activation des neurones donc pendant les périodes de stimulation sensorielle ou d'apprentissage.

### **3.3 Rôle dans le transport des ARNm et dans la régulation de la traduction locale**

#### **i. Régulation du transport des ARNm**

FMRP régule le transport de ses ARNm cibles. Elle est capable d'agir sur leur transport de différentes manières : elle agirait lors de l'export des ARNm hors du noyau, lors de leur transport du corps cellulaires vers les neurites et lors de l'editing des ARNm.

FMRP possède des séquences de localisation et d'export nucléaire (SLN et SEN), ce qui a mené à l'hypothèse qu'elle servirait de navette qui transporte les ARNm en dehors du noyau (Feng et al., 1997). Il a été montré que FMRP interagit avec Tap/NFX1, qui exporte de nombreux ARNm hors du noyau (Kim, Bellini, & Ceman, 2009). Lors de cette interaction, l'action de FMRP serait de faciliter la sortie des ARNm du noyau vers le cytoplasme.

En réponse à l'activation des mGluR, FMRP agit aussi sur la motilité des granules dans lesquelles elle est présente avec ses ARNm cibles (Kao, Aldridge, Weiler, & Greenough, 2010). FMRP semble servir d'adaptateur entre les granules contenant les ARNm et les moteurs moléculaires qui permettent leurs déplacements sur le réseau du cytosquelette (Dictenberg et al., 2008).

FMRP aurait aussi un rôle dans l'editing. Chez la drosophile, FMRP agit dans le noyau en association avec l'enzyme catalysant l'editing des ARNm (Bhogal et al., 2011). Or, l'editing des ARNm comme évoqué précédemment, participe à l'adressage des ARNm, ce qui a été démontré pour l'ARNm de sous-unités des récepteurs AMPA qui sont des cibles de FMRP (La Via et al., 2013).

## ii. Régulation de la traduction locale

### a. FMRP inhibe la traduction locale

De manière générale, FMRP inhibe la traduction, ce qui a été démontré pour la première fois dans un système de traduction *in vitro* dans des lysats de réticulocytes (Laggerbauer et al., 2001). Selon son état de phosphorylation, l'action de FMRP sur la traduction locale peut changer (Ceman, 2003; Coffee et al., 2012; Muddashetty et al., 2011). L'étude de Kao et al (2010) sur des cultures de neurones d'hippocampe a montré qu'en réponse à une stimulation des mGluR, une fois l'ARNm de  $\alpha$ CamKII transporté jusqu'à sa destination, FMRP permet sa traduction (Kao et al., 2010). Dans des synaptosomes, FMRP se lie spécifiquement à ses ARNm cibles. En son absence, certains d'entre eux sont plus enrichis dans la fraction de polysomes actifs suggérant que ces ARNm seront plus traduits qu'en condition sauvage. De plus, en absence de FMRP, une stimulation des récepteurs mGluR ne permet pas d'augmenter la présence de ces ARNm dans la fraction de polysomes actifs (Muddashetty, Kelić, Gross, Xu, & Bassell, 2007). Ceci suggère qu'une stimulation des récepteurs mGluR en absence de FMRP ne permet pas d'augmenter la traduction de ses cibles comme en condition sauvage. FMRP apparaît alors comme un inhibiteur de la traduction en condition basale, qui lors d'une activation des récepteurs mGluR, est déphosphorylée, lève son inhibition et permet alors la traduction de ses cibles en réponse à la stimulation. En absence de FMRP, le niveau basal de protéines est plus élevé et ne peut être augmenté en réponse à une stimulation.

#### b. Mécanismes d'action de FMRP sur la traduction locale.

Les moyens utilisés par FMRP pour réguler la traduction sont sujets de débat. Différentes études rapportent qu'elle peut jouer sur l'initiation ou l'élongation de la traduction ainsi que la stabilité des ARNm en association avec des partenaires protéiques, des ARN non codants, ou seule.

##### Action de FMRP sur l'initiation de la traduction :

Cytoplasmic Fmrp Interacting Protein (CyFIP), est une protéine qui se lie à eIF4E, protéine faisant partie du complexe d'initiation de la traduction, pour empêcher le début de la traduction. Selon des expériences menées par Napoli et al., (2008), CyFIP serait recruté par FMRP au niveau de l'ARNm avant l'initiation.

##### Actions de FMRP sur l'élongation :

FMRP bloquerait le passage des ribosomes sur ses ARNm cibles de manière réversible (Darnell et al., 2011). Récemment, une autre équipe a montré que FMRP se lie directement aux ribosomes près du site de liaison de l'ARNt, via son domaine KH1 (Chen et al., 2014). Muddashetty et al ont montré que l'inhibition de la traduction de PSD95 requiert la coopération de FMRP et mir125a. FMRP permettrait la formation du complexe mirRISC sur l'ARNm de PSD95 (Muddashetty et al., 2011).

##### Action de FMRP sur la stabilisation des ARNm

Enfin une étude montre que FMRP permet la stabilisation de l'ARNm de Arc, via liaison sur son 3'UTR, et cette stabilisation est encore augmentée en réponse à l'activation des mGluR (Zalfa et al., 2007).

À l'heure actuelle il n'y a pas de consensus sur l'action précise de FMRP pour inhiber la traduction, mais on ne peut pas exclure que FMRP puisse agir par la combinaison de plusieurs mécanismes, en fonction des besoins, de la localisation subcellulaire, ou de l'ARNm inhibé. Par ailleurs, l'inhibition de la traduction locale exercée par FMRP serait régulée selon l'état de phosphorylation de FMRP et de manière dépendante de l'activité (Ceman, 2003; Coffee et al., 2012; Muddashetty et al., 2011).

#### iii. Les ARNm cibles de FMRP

FMRP serait capable de se lier à près de 4% des ARNm du cerveau murin (Brown et al., 2001). Plusieurs laboratoires ont réalisé des expériences de séquençage haut débit d'ARNm pour identifier les ARNm régulés par FMRP (Ascano et al., 2012;

Brown et al., 2001; Darnell et al., 2011; Miyashiro et al., 2003). Plusieurs milliers d'ARNm seraient régulés par FMRP, mais seuls quelques-uns parmi eux ont été validés par des expériences de biochimie. Je citerai ici quelques-uns des ARNm cibles de FMRP, parmi les plus connus et qui ont été validés par plusieurs études (Pasciuto & Bagni, 2014) :

- $\alpha$ CamKII , dont la traduction locale est nécessaire la plasticité synaptique et à la mémoire (Miller et al., 2002),
- Map1B, un composant important du cytosquelette microtubulaire qui est nécessaire au développement dendritiques et à la maturation des synapses (Tortosa et al., 2011),
- MAP2 qui est impliqué dans la stabilité des microtubules (Takemura et al., 1992)
- Fmr1, son propre ARNm
- PSD95, une protéine d'échafaudage majoritaire dans la densité post-synaptique.
- Arc (activity regulated cytoskeleton associated protein), qui fait partie des immediate early gene, et est nécessaire à différentes formes de plasticités (Bramham, Worley, Moore, & Guzowski, 2008)
- Des sous-unités des récepteurs NMDA (Bostrom et al., 2013)
- Des sous unités des récepteurs mGluR5 (Darnell et al., 2011)

Dans l'ensemble, la majorité des ARNm cibles de FMRP sont des acteurs majeurs dans la plasticité synaptique. On trouve des effecteurs de la transduction du signal nerveux, des récepteurs aux neurotransmetteurs, des éléments de la densité post-synaptique, qui participent à la structure des épines, des éléments associés au cytosquelette etc... On comprend alors qu'une perte de régulation par FMRP induise des changements de structure synaptique. Le rôle de FMRP est donc crucial pour permettre une expression coordonnées et équilibrée de toutes ces protéines.

### **3.4 FMRP joue un rôle dans le développement**

Étant donné le rôle de la traduction locale dans le développement, et l'importance de FMRP dans la régulation de la traduction locale, on comprend que

FMRP puisse avoir un rôle dans le développement du cerveau. FMRP est exprimée pendant le développement du système nerveux et son absence induit des défauts de développement et d'organisation des circuits pendant les périodes critiques. Ici seront énoncés quelques exemples montrant l'importance de FMRP dans le développement neuronal à travers des études *in vitro* et *in vivo*.

i. Observations *in vitro*

FMRP est présente dans les axones en développement de neurones en culture (Antar, Li, Zhang, Carroll, & Bassell, 2006; Hengst, Cox, Macosko, & Jaffrey, 2006). En son absence, le cône de croissance présente un excès de filopodes et une motilité réduite associés à une progression moins rapide (Antar et al., 2006). La catastrophe normalement induite en présence de Sema3A ne se produit pas dans des neurones qui n'expriment pas FMRP. De plus, cette insensibilité est associée à une absence d'augmentation de l'expression de la protéine Map1B dans le cône de croissance (Li, 2009). L'expression aigue de FMRP dans des neurones d'hippocampe en culture de souris *Fmr1* KO prélevés à P6-7 induit la formation de d'éléments post-synaptiques (Zang et al., 2013). En revanche sur des neurones provenant de souris à P13-16, l'expression de FMRP induit l'élimination de synapses (Zang et al., 2013). Ces résultats suggèrent que FMRP possède un rôle dans le développement neuritiques et synaptique et que son action peut changer selon les différentes périodes développementales.

ii. *In vivo*, un rôle dans les périodes critiques

Une période critique peut être définie comme un laps de temps pendant lequel la connectivité du réseau neuronal est une période de sensibilité maximale à l'influence de l'environnement. C'est une période de plasticité synaptique et structurelle accrue. Les remodelages induits pendant ces périodes permettent notamment d'ajuster la balance entre excitation et inhibition des neurones via l'élimination de certaines synapses. L'hypersensibilité sensorielle et la susceptibilité aux crises épileptiques audiogènes caractéristiques du SXF sont attribuées à des défauts du ratio excitation/inhibition.

- a. L'expression de FMRP est augmentée lors de certaines périodes critiques de développement.



Chez la souris, FMRP est détectée dans des granules de manière plus abondante lors de périodes développementales de plasticité synaptique accrue qui correspondent à des périodes critiques. La densité de ces granules est augmentée dans différentes régions du cerveau pendant une courte période de la vie post-natale avec un pic à P15 (Christie et al., 2009). Dans le cortex somato-sensoriel primaire, FMRP est plus fortement exprimée à P14 et P21, courtes périodes de remodelages synaptiques et dendritiques (Till et al., 2012). Chez la drosophile, l'expression de FMRP est augmentée pendant une brève période du développement tardif du système nerveux central de la drosophile (Tessier & Broadie, 2008).

b. Des défauts de maturation associés à des périodes critiques de développement chez les souris *Fmr1* KO et les drosophiles *dfmr1*.

Les souris *Fmr1* KO présentent des défauts lors de périodes critiques de développement. Il s'agit souvent de retards dans le déroulement des périodes critiques (Cruz-Martín, Crespo, & Portera-Cailliau, 2010; Harlow et al., 2010; Till et al., 2012) associés à différents défauts synaptiques ou structuraux des neurones en développement.

Défauts synaptiques :

Dans la couche IV du cortex somato-sensoriel associé aux vibrisses, les souris *Fmr1* KO présentent un plus grand nombre de synapses silencieuses persistantes pendant des stades de développement tardifs, ainsi qu'un retard de la période critique de plasticité synaptique (Harlow et al., 2010).

Défauts de plasticité structurelle des épines dendritiques :

Dans le cortex somato-sensoriel primaire, les épines dendritiques des neurones de des couches II/III présentent un retard de stabilisation pendant une période critique durant laquelle les « mushroom » remplacent les filopodes (Cruz-Martín et al., 2010).

Défauts de développement dendritique ou axonal :

Dans le cortex somato-sensoriel primaire, la mise en place de la carte topographique est retardée chez les souris *Fmr1* KO (Till et al., 2012). Ce retard est associé à des défauts de morphologie dendritique et des épines des neurones de la couche IV (Till et al., 2012). Dans le cortex somato-sensoriel associé aux vibrisses, les axones des neurones de la couche IV sont plus long mais ne parviennent pas à établir de connections avec les neurones de la couche III (Bureau, Shepherd, & Svoboda, 2008). Chez la drosophile *dfmr1* les neurones du mushroom body, région

particulièrement plastique du cerveau de la drosophile participant à la mémoire et l'apprentissage (Michel, 2004), présentent des axones plus long (Tessier & Broadie, 2008).

Défauts de remodelage dendritique en réponse à l'activité :

Dans le cortex auditif, le développement de la représentation corticale des sons est normal, mais l'expérience auditive ne permet pas de remodelage (H. Kim, Gibboni, Kirkhart, & Bao, 2013). Chez la drosophile, des neurones externes au mushroom body présentent des défauts de remodelage dendritique en réponse à l'activité lors d'une période critique de développement (C. a. Doll & Broadie, 2015).

FMRP est donc nécessaire remodelage des circuits en réponse à l'activité pendant les périodes critiques de développement. Elle semble permettre la maturation des épines dendritique et limiter la croissance neuritique de façon dépendante de l'activité.

### **3.5 Un rôle dans la plasticité**

Les problèmes de mémoire et d'apprentissage associés à une densité d'épines augmentée d'apparence immature chez les patients et chez les souris *Fmr1* KO ont mené à l'hypothèse que le SXF serait principalement dû à des défauts plasticité synaptique.

#### **i. Un rôle dans la plasticité synaptique**

##### **a. La plasticité dépendante des mGluR et la « théorie mGluR du SXF ».**

La LTD induite par l'activation des récepteurs mGluR de groupe 1 (mGluR-LTD) est une forme de plasticité synaptique qui nécessite une synthèse protéique (Nakamoto et al., 2007). Elle induit l'internalisation de récepteurs AMPA ce qui diminue l'excitabilité des neurones. Elle peut être induite par l'application de DHPG, un antagoniste des récepteurs mGluR, ou par stimulations de basse fréquence. L'activation des récepteurs mGluR induit une synthèse protéique (Job & Eberwine, 2001; Weiler & Greenough, 1993). Le premier lien entre la signalisation mGluR et FMRP a été la découverte que FMRP est synthétisée en réponse à l'activation des récepteurs mGluR par le DHPG (Dilja D. Krueger & Bear, 2011). Ce résultat a lancé

les études sur la mGluR-LTD chez les souris *Fmr1* KO. Chez ces souris, la mGluR-LTD est altérée : elle est exagérée dans l'hippocampe et le cervelet (Hou et al., 2006; Huber, Gallagher, Warren, & Bear, 2002). De plus elle ne nécessite plus la synthèse de nouvelles protéines (Nosyreva & Huber, 2006; J. Zhang, Hou, Klann, & Nelson, 2009). Les protéines nécessaires à l'internalisation des récepteurs AMPA sont déjà présentes et surexprimées dans les dendrites. Ces résultats suggèrent que FMRP inhibe la synthèse des protéines nécessaires à la mGluR-LTD. C'est à partir de là qu'est née la théorie mGluR du SXF selon laquelle FMRP et la signalisation via les mGluR agissent en opposition fonctionnelle pour réguler la quantité de protéines nouvellement synthétisées au niveau des synapses. Afin de tester cette hypothèse, différentes expériences ont été réalisées. La surexpression de FMRP chez des souris *Fmr1* KO pendant la période post-natale restaure le besoin de synthèse protéique pour le déroulement de la mGluR-LTD dans l'hippocampe (Zeier et al., 2009). La preuve la plus convaincante en faveur de la théorie mGluR du SXF provient des souris *Fmr1* KO croisées avec des souris hétérozygotes pour le gène *gmr5* (codant l'expression du récepteur mGluR5). Dans les souris *Fmr1* KO résultantes, l'expression des récepteurs mGluR5 est réduite de 50%. Ces souris présentent une synthèse protéique et une LTD normales, associées au sauvetage de nombreux phénotypes caractéristiques des souris *Fmr1* KO (Dölen et al., 2007). Ce sauvetage génétique, a conduit à l'idée que les récepteurs mGluR de groupe 1 représentent une bonne cible thérapeutique pour le traitement du SXF. Ainsi, plusieurs études testant l'effet du MPEP, un antagoniste des récepteurs mGluR5, sur les souris *Fmr1* KO ont suivi. Différents groupes ont montré des effets bénéfiques du MPEP sur le phénotype des souris : réduction des crises épileptiques audiogènes, et d'autres déficits comportementaux (Krueger & Bear, 2011). L'ensemble de ces résultats suggère que les récepteurs mGluR représentent une bonne cible thérapeutique pour le traitement du SXF. Récemment, des études cliniques utilisant un antagoniste des récepteurs mGluR, fenobam, ont révélé des résultats décevants (Scharf, Jaeschke, Wettstein, & Lindemann, 2014). Cependant, ces essais ont été réalisés chez des patients adultes et à l'aide d'une seule dose. Un traitement prolongé chez des jeunes patients pourrait peut être se révéler plus efficace (Gross, Hoffmann, Bassell, & Berry-Kravis, 2015).

b. FMRP joue un rôle dans d'autres formes de plasticité synaptique

Le rôle de FMRP a surtout été caractérisé dans la traduction locale induite par l'activation des mGluR, mais FMRP est aussi importante pour d'autres formes de plasticités synaptiques, comme la plasticité dépendante des récepteurs trkB activés par le BDNF. L'activation de trkB, comme celle des mGluR induit la traduction locale par la voie de signalisation MEK/ERK. Chez les souris *Fmr1* KO les protéines induites par l'activation de trkB sont surexprimées à l'état basal et leur expression ne peut plus être augmentée en réponse à l'activation du récepteur (Osterweil, Krueger, Reinhold, & Bear, 2010). Dans le gyrus dentelé de l'hippocampe, l'absence de FMRP induit une réduction du niveau d'expression des sous-unités des récepteurs NMDAR, GluN2 A et B, diminuant l'intensité de la LTP induite par ces récepteurs (Bostrom et al., 2013). FMRP intervient également dans la plasticité homéostatique qui nécessite aussi la synthèse de nouvelles protéines (Soden & Chen, 2010).

## ii. Un rôle dans la plasticité structurelle

### a. La plasticité structurelle des épines

L'apparence immature des épines dendritiques est le premier défaut anatomique des neurones qui a été observé chez les patients atteints du SXF et les souris *Fmr1* KO (Comery et al., 1997). De manière générale, elles apparaissent plus longues, plus fines et parfois en plus grande densité. Ces caractéristiques ont été observées dans plusieurs régions du cerveau murin comme le cortex visuel, l'hippocampe, le cervelet, l'amygdale et le bulbe olfactif (He & Portera-Cailliau, 2013). Un défaut d'élagage des épines immatures pourrait être à l'origine de la densité élevée d'épines dans certaines régions du cerveau (Pfeiffer & Huber, 2007).

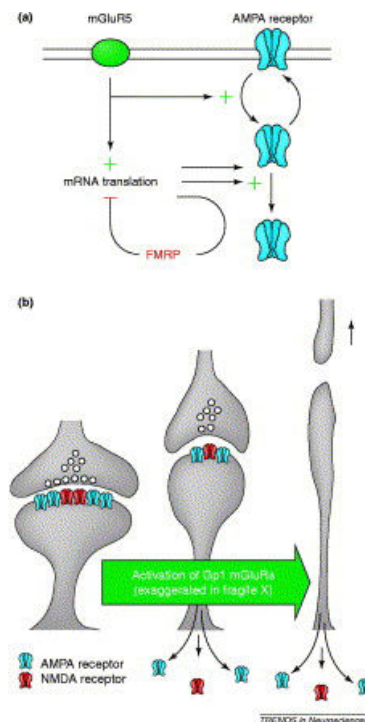
La morphologie anormale des épines dendritique des neurones *Fmr1* KO est associée à une stabilité amoindrie. Dans le cortex, lors des deux premières semaines de la vie post-natale, la dynamique des épines dendritiques diminue et ceci est associé au remplacement des filopodes et épines immatures par des épines dendritiques de type « mushroom » (Cruz-Martín et al., 2010). Dans les neurones des souris *Fmr1* KO, la diminution de cette dynamique est retardée et la transition entre filopodes et « mushroom » est altérée (Cruz-Martín et al., 2010). Des défauts de stabilité des épines des neurones *Fmr1* KO ont aussi été observés chez des souris adultes au niveau du cortex somato-sensoriel associé aux vibrisses (Pan, Aldridge, Greenough, & Gan, 2010). Ces résultats suggèrent que les protrusions

*Fmr1* KO ont des difficultés à maintenir un équilibre entre stabilité et dynamique (Antar et al., 2006).

Ces épines semblent être insensibles à différents paradigmes induisant normalement des variations de densité ou des changements morphologiques. Dans des cultures de neurones d'hippocampe sauvages, une stimulation par application de KCl augmente le nombre d'épines dendritique. En revanche, dans les neurones *Fmr1* KO, une telle stimulation n'a aucun effet sur la densité des épines dendritiques (Antar et al., 2006). *In vivo*, un stress chronique augmente la densité et modifie la morphologie des épines des neurones de l'amygdale basolatérale chez les souris sauvages. Chez les souris *Fmr1* KO ces effets sont absents (Qin, Xia, Huang, & Smith, 2011). Dans le cortex somato-sensoriel, une stimulation des vibrisses induit normalement l'élimination et la création de nouvelles épines. Ce phénomène est également absent chez les souris *Fmr1* KO (Pan et al., 2010).

On peut expliquer les défauts de morphologie et de stabilité des épines dendritiques des neurones *Fmr1* KO de différentes manières. 1) La théorie mGluR du SXF propose que la suractivation de la LTD induirait un affinement des épines dendritique via l'internalisation des récepteurs AMPA (Fig. 5) (Bear, Huber, & Warren, 2004). 2) Parmi les cibles traductionnelles de FMRP, certaines sont impliquées dans la morphologie des épines dendritiques comme Rac1,  $\alpha$ CamKII, PSD 95 et MMP-9. Rac1 et  $\alpha$ CamKII régulent la formation et la stabilisation des épines dendritiques. La petite GTPase Rac1 est nécessaire à la formation des épines et son activation dans les épines dendritiques induit leur affinement (Caleb a Doll & Broadie, 2014; Hayashi-Takagi et al., 2015; Tashiro, Minden, & Yuste, 2000). L'accumulation de  $\alpha$ CamKII dans les épines induit leur maturation et les stabilise (Ahmed, Zha, Green, & Dailey, 2006). PSD 95 et MMP-9 sculptent la morphologie des épines dendritiques. PSD 95, est un composant majeur de la densité post-synaptique participant à l'architecture des épines dendritiques (Zalfa et al., 2007). MMP-9 (Matrix MetalloProtéinase) est impliquée dans la réorganisation de l'architecture des épines de manière dépendante de l'activité (Janusz et al., 2013).

Ces résultats soulignent le besoin d'études complémentaires qui permettraient de démontrer un lien de causalité entre la régulation traductionnelle des cibles de FMRP, la stabilité et la morphologie des épines dendritiques et l'insensibilité des épines des neurones *Fmr1* KO.



**Figure 5 : Modèles des conséquences de l'activation des mGluR de groupe 1 sur la structure des épines dendritique et le rôle de FMRP.** (a) Schéma de la surface de la membrane post-synaptique. L'activation des mGluR5 stimule la synthèse d'ARNm qui permettent l'internalisation des récepteurs AMPA lors de la LTD. FMRP agit en opposition à l'action de l'activation des mGluR5 en inhibant cette traduction. (b) En absence de FMRP, la traduction locale induite par signalisation des mGluR est dérégulée et induit une internalisation exagérée des récepteurs AMPA modifiant alors la morphologie de l'épine dendritique, qui apparaît fine et longue. Tirée de (Bear et al., 2004).

#### b. Le rôle de FMRP dans La plasticité dendritique des nouveaux neurones du cerveau adulte

FMRP possèdent aussi un rôle dans la structure des dendrites. Ce rôle a surtout été observé pendant le développement puisque les neurones matures sont très peu sujets aux remodelages dendritiques. Cependant les nouveaux neurones issus de la neurogénèse adulte ont conservé une plasticité plus importante. Dans le bulbe olfactif, suite à une privation olfactive, l'arborisation dendritique des nouveaux neurones est plus courte que dans les conditions contrôles. En revanche la privation olfactive n'a aucun effet sur l'arborisation dendritique des neurones qui n'expriment pas FMRP (Scotto-Lomassese et al., 2011). Ceci suggère que les nouveaux

neurones qui n'expriment pas FMRP sont incapables de remodeler leur arborisation dendritique en réponse à un changement de perception sensorielle.

Les neurones dépourvus de FMRP semblent rester insensibles à l'influence de l'environnement *in vivo* comme *in vitro*. En absence de FMRP, pendant les périodes critiques de développement ou dans les neurones du cerveau adulte, le remodelage des épines ou des dendrites en réponse à l'activité semble aboli. Ceci suggère que FMRP serait le médiateur entre l'environnement et l'adaptation des neurones face à cet environnement.

#### **4. Le bulbe olfactif (BO)**

Le BO est le premier relai de l'information olfactive. C'est une partie extrêmement plastique du cerveau murin puisqu'il reçoit des nouveaux neurones tout au long de la vie de l'animal. Lors de ma thèse je me suis servie du BO comme modèle de plasticité, ce qui m'a permis d'étudier l'importance de la traduction locale dans la plasticité structurelle en réponse à un apprentissage. Dans cette partie je présenterai le BO comme partie intégrante du système olfactif puis je décrirai la participation des neurones issus de la neurogénèse adulte dans la plasticité du BO.

##### **4.1 Le système olfactif**

Le système olfactif est à la base du sens de l'odorat. Il est essentiel à la survie de l'animal car il lui permet de sentir son environnement, ou de trouver de la nourriture. Un second système olfactif est également présent chez les vertébrés, dit « accessoire » ou « voméronasal », qui lui, permet de détecter les phéromones et qui est donc associé aux comportements sociaux et à la détection des prédateurs. Cette structure étant à part et dans un souci de clarté je ne parlerai que du système olfactif principal. On peut décomposer le système olfactif principal en trois parties anatomiques et fonctionnelles distinctes : (i) l'épithélium olfactif reçoit l'information olfactive, qui l'envoie au (ii) bulbe olfactif qui traite et module l'information olfactive pour l'envoyer au (iv) cortex olfactif, lieu d'intégration de cette information.

i. L'épithélium olfactif.

L'épithélium olfactif couvre la partie dorsale de la cavité nasale. Il est constitué de trois types cellulaires, les neurones sensoriels olfactifs (NSO), les cellules sustentaculaires qui sont des cellules de soutien pour les NSO, et une population de cellules souches qui donnent naissance aux NSO et qu'on appelle cellules basales. Les NSO sont les récepteurs des odeurs. Ils étendent leur dendrite unique qui se termine en un bouton recouvert de nombreux cils (20 à 30) à la surface de l'épithélium olfactif dans la lumière de la cavité nasale. À leur surface, ils expriment des récepteurs aux molécules odorantes, ce sont les récepteurs olfactifs (RO). Chaque NSO exprime un seul type de RO. Au sein de l'épithélium, les NSO sont répartis de manière aléatoire. En revanche, toutes les terminaisons axonales des NSO exprimant le même RO convergent pour se projeter dans le même glomérule du BO (Firestein, 2001).

ii. Le BO

Le BO est le premier relai de l'information olfactive. Il se trouve dans la partie antérieure du cerveau murin. Il est composé de différentes couches cellulaires concentriques. Le BO contient deux grand types de neurones : des neurones excitateurs glutamatergiques (cellules mitrales et tufted-cells) et des interneurons inhibiteurs GABAergiques (neurones périglomérulaires et cellules granulaires).

a. Les différentes couches du BO et différents types cellulaires qui les habitent.

Les couches superficielles

En surface, la couche du nerf olfactif est composée des axones des NSO, qui vont atteindre leurs cibles dans la couche glomérulaire (CG). Dans la CG, les glomérules sont des structures sphériques de 50 à 100µm de diamètre, constituées de neuropile, où les terminaisons axonales des NSO forment des synapses excitatrices glutamatergiques sur les dendrites des cellules principales du BO, les cellules mitrales et tufted-cells (cellules M/T). Chaque glomérule est contacté par les axones des NSO qui expriment tous le même RO. Les corps cellulaires des tufted-cells se trouvent dans l'espace interglomérulaire. Ces neurones envoient leurs projections axonales dans la partie antérieure du cortex olfactif. On y trouve également les neurones périglomérulaires (NPG). Un NPG étend ses dendrites dans un glomérule



et envoie son axone vers un autre glomérule. Ces interneurons permettent la communication interglomérulaire.

#### La couche des cellules mitrales

Les cellules mitrales sont des neurones excitateurs qui envoient leurs axones dans des structures supérieures du cerveau comme le cortex olfactif, l'amygdale et l'hippocampe. Leurs corps cellulaires forment une monocouche qui entoure la couche granulaire.

#### La couche granulaire et la couche plexiforme externe

Ces deux couches se situent de part et d'autre de la couche de cellule mitrales. La couche granulaire est la couche la plus volumineuse et la plus centrale du BO. Y résident les corps cellulaires des cellules granulaires qui sont des interneurons GABAergiques, qui n'ont pas d'axones, mais une longue dendrite apicale qui s'étend jusque dans la couche plexiforme externe. Cette couche est principalement constituée de neuropile où les dendrites des cellules granulaires s'arborescent pour contacter les dendrites des cellules mitrales, via des interactions très particulières puisqu'il s'agit de synapses réciproques dendro-dendritiques. Dans la couche plexiforme externe, se trouvent également les corps cellulaires des neurones périglomérulaires, qui de même, n'ont pas d'axones mais dont les dendrites contactent les cellules M/T. Les cellules granulaires et neurones périglomérulaires sont les neurones qui sont en permanence renouvelés par la neurogénèse adulte.

#### b. La connectivité dans le bulbe olfactif

Le signal olfactif est perçu par les NSO qui envoient cette information aux cellules M/T. Les cellules M/T sont les neurones qui permettent la réception de l'information dans le BO grâce à leur dendrite apicale principale et l'envoi de cette information vers le cortex olfactif via leur axone. Une fois le signal arrivé dans une cellule M/T, ce signal se propage latéralement dans les cellules mitrales voisines via leurs dendrites secondaires. Les cellules mitrales activées, activent à leurs tours les cellules granulaires. Celles-ci vont alors répondre par la libération de GABA sur les mêmes cellules M/T induisant ainsi une inhibition réciproque. Les cellules granulaires activées peuvent aussi inhiber les cellules M/T voisines ce qui alors stoppera la propagation latérale du signal olfactif dans d'autres cellules M/T. C'est ce qu'on appelle l'inhibition latérale de l'information. (Nagayama, Homma, & Imamura, 2014).

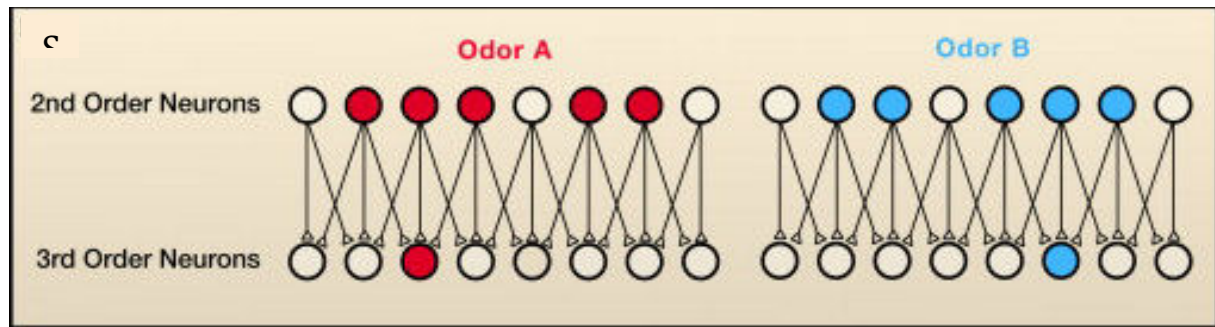
### iii. Le cortex olfactif (CO)

#### a. Du BO au CO

Le CO est subdivisé en plusieurs régions que je ne détaillerai pas ici, car cela n'apporte pas à la compréhension de mon sujet d'étude. Le CO reçoit les fibres axonales des cellules M/T qui activent les cellules pyramidales. C'est la combinaison de plusieurs cellules M/T qui peut activer une seule cellule pyramidale. Ainsi, le nombre de neurones activés dans le BO est beaucoup plus important que le nombre de neurones activés dans le CO par une odeur. Ceci permet la discrimination d'odeurs qui activeraient une combinaison de NSO similaires (Fig. 6) (Su, Menuz, & Carlson, 2009).

#### b. Du CO au BO

La perception des odeurs nécessite également un traitement de l'information depuis des régions supérieures du cerveau jusqu'au bulbe. Il existe deux voies dites centrifuges ; l'une part du cortex olfactif, et l'autre part d'autres régions non corticales, mais toutes deux vont activer les cellules granulaires du BO. Ces fibres centrifuges régulent l'inhibition latérale des cellules M/T. La communication entre le BO et ces régions permettent de moduler la perception olfactive par l'expérience et l'apprentissage et permettent donc de façonner le comportement olfactif (Su et al., 2009).



**Figure 6:** Schéma représentant la connectivité entre les neurones de 2nd ordre qui résident dans le bulbe olfactif, les cellules M/T, et les neurones de 3ème ordre, les cellules pyramidales du CO. Une odeur A et une odeur B présentent des patrons d'activation des cellules M/T similaires. Cependant, grâce à la nécessité de la co-activation de plusieurs cellules M/T pour activer une cellule pyramidale du CO, beaucoup moins de neurones sont activés dans le CO que dans le BO. Ainsi, les odeurs A et B présentent des patrons d'activation corticaux distincts, permettant ainsi leur discrimination (Su et al., 2009).

#### 4.2 Les cellules granulaires du BO tiennent un rôle central dans la plasticité du BO

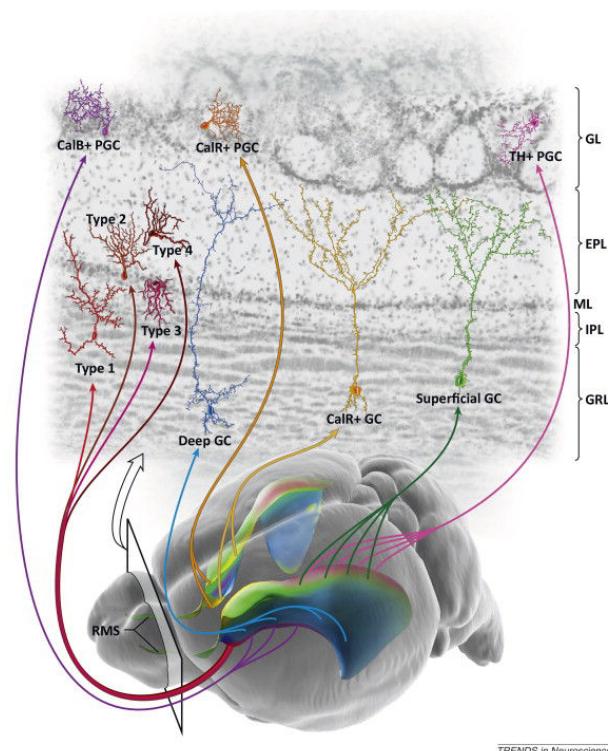
Une partie des cellules granulaires est générée pendant la vie embryonnaire. Une autre partie de ces neurones est constamment renouvelée lors de la neurogénèse adulte. Comme évoqué précédemment, ces neurones présentent des caractéristiques plastiques inégalées dans le cerveau adulte. Dans cette partie, je décrirai les cellules granulaires puis j'exposerai les éléments montrant leur rôle important dans la plasticité du BO.

##### i. Les cellules granulaires dans le BO.

###### a. Hétérogénéité

Les cellules granulaires du BO ne forment pas une population homogène. En effet elles présentent des caractéristiques morphologiques différentes selon la position de leur corps cellulaires dans la couche granulaire (superficielle, intermédiaire ou profonde). L'identité de ces cellules est déterminée dès leur production dans la ZSV. Les progéniteurs neuronaux, dans la zone sous-ventriculaire, présentent déjà des identités différentes. Selon leur localisation dans la ZSV, ils donneront naissance à des NPG de différents types, des cellules granulaires superficielles, intermédiaires

ou profondes et 4 autres sous-types d'interneurones (Fig. 7). (Lim & Alvarez-buylla, 2014), ou encore des neurones glutamatergiques juxtaglomérulaire (Brill et al., 2009).



**Figure 7: Organisation régionale des cellules souches neurales de la ZSV.**

Vue oblique du cerveau adulte murin. La coloration indique la régionalisation de la ZSV. Les cellules nées dans les différentes régions migrent ensemble dans le CMR jusqu'au BO, où elles se différencient en différents types d'interneurones selon leur origine dans la ZSV. GL : couche glomérulaire ; EPL : couche externe plexiforme ; ML : couche des cellules mitrales ; IPL : couche plexiforme interne ; GRL : couche des cellules granulaires ; PGC : neurone périglomérulaire ; TH : tyrosine hydroxylase ; GC : cellule granulaire.

Adapté de Lim & Alvarez-buylla, 2014.

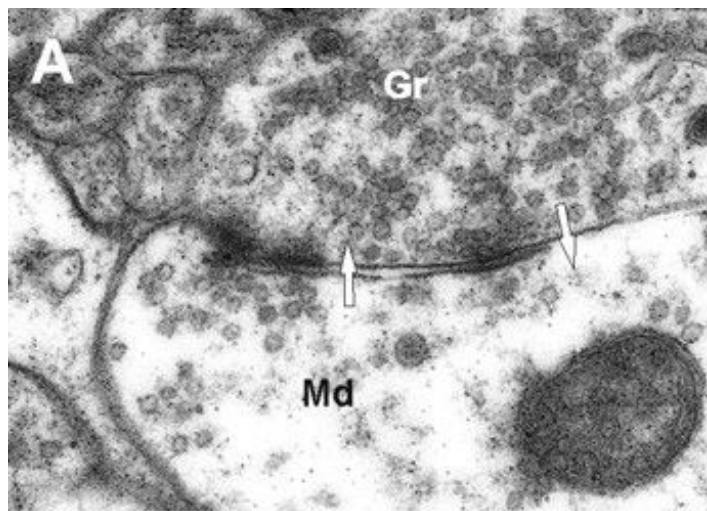
#### b. Connectivité des cellules granulaires

Les cellules granulaires peuvent recevoir des courants excitateurs de deux côtés : du côté distal, au niveau de l'arborisation dendritique qui s'étend dans la couche externe plexiforme, et du côté proximal au niveau des dendrites basales, dans la couche granulaire.

La synapse dendro-dendritique dans la couche plexiforme externe.

Les cellules mitrales et les cellules granulaires partagent une synapse très particulière puisqu'elle est réciproque et dendro-dendritique (Fig. 8). Les cellules mitrales y libèrent du glutamate, et les cellules granulaires activées répondent par la libération de GABA sur les mêmes ou d'autres cellules mitrales. Les corps cellulaires des cellules mitrales peuvent être situés jusqu'à 1 mm de distance. L'inhibition exercées par les cellules granulaires est spatialement très étendue et chaque

cellules granulaires peut inhiber des cellules mitrales dépendant de glomérules différents. Cette organisation du réseau semble être importante dans la séparation des patrons d'activation neuronale dans le BO et semble donc améliorer la discrimination des odorants. L'activation des cellules granulaires par les cellules mitrales dépend des NMDAR qui peuvent être bloqués par des ions  $Mg^{2+}$  (Shepherd, Chen, Willhite, Migliore, & Greer, 2007). Les cellules granulaires expriment également d'autres récepteurs du glutamate que les NMDAR. Elles expriment très fortement des mGluR de groupe 1 (mGluR1 et mGluR5). Les cellules granulaires de la couche superficielle expriment plutôt mGluR1, tandis que les cellules granulaires de la couche profonde expriment plutôt mGluR5 (Dong, Heinbockel, Hamilton, Hayar, & Ennis, 2009). Ils sont présents au niveau des synapses dendro-dendritiques et semblent tenir un rôle très important dans l'excitabilité de ces cellules. L'inactivation de ces récepteurs induit une baisse de l'inhibition réciproque des cellules mitrales par les cellules granulaires qui s'explique par une baisse de l'excitabilité des cellules granulaires (Dong et al., 2009). Étant donné le rôle clé des récepteurs NMDA dans l'inhibition dendro-dendritique, il semblerait que les mGluR permettent de dépolariser les cellules granulaires pour faciliter l'activation des récepteurs NMDA nécessaire à la libération de GABA (Dong et al., 2009) .



**Figure 8: La synapse dendro-dendritique.** Image de microscopie électronique à transmission montrant une synapse réciproque entre une cellule mitrale (Md) et une cellule granulaire (Gr). On observe la présence de vésicules synaptiques des deux côtés de la synapse. Ainsi qu'un épaissement des deux membranes.

Du côté proximal, les fibres centrifuges forment des synapses excitatrices classiques sur les dendrites basales des cellules granulaires. Une stimulation téτανique au niveau de ces synapses lève le blocage des ions  $Mg^{2+}$  des synapses distales des cellules granulaires. Ceci montre l'importance des courants excitateurs sur les dendrites basales pour le déclenchement de l'inhibition des cellules mitrales par les cellules granulaires (Balu, Pressler, & Strowbridge, 2007).

## ii. Le rôle des nouveaux neurones dans la plasticité du BO

Le réseau du BO est extrêmement plastique en réponse à l'expérience et à l'apprentissage olfactifs. Par exemple, la réponse des cellules mitrales à une odeur change si elle est associée à un stimulus positif ou négatif (Doucette & Restrepo, 2008; Doucette et al., 2011; Kay & Laurent, 1999). Cette adaptation comportementale est associée à l'évolution de la réponse oscillatoire du réseau entier du BO (Martin, 2004). L'expérience et l'apprentissage olfactifs ont une forte influence sur la représentation des odeurs. De plus, les cellules granulaires issues de la neurogénèse adulte sont particulièrement sensibles à l'influence de l'environnement et il est clair qu'elles ont un rôle important dans la plasticité du BO (Alonso et al., 2012). Ceci a été démontré notamment pour deux paradigmes d'apprentissage olfactif :

- Apprentissage de l'association d'une odeur à une récompense: apprentissage associatif
- Discrimination de deux odorants proches acquise par l'expérience : apprentissage perceptif

#### L'apprentissage associatif

La moitié des nouveaux neurones du BO adulte meurent entre 15 et 45 jours après leur naissance (Nathalie Mandaïron, Sacquet, et al., 2006; Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002), mais certains d'entre eux peuvent être sauvés grâce à l'apprentissage (Alonso et al., 2006). Ces résultats ont mené à l'hypothèse que la persistance des nouveaux neurones permet la mémorisation de la tâche. Pour tester cette hypothèse, des expériences de blocage de la neurogénèse adulte par infusion d'un antimitotique, l'AraC, ou par irradiation au niveau de la ZSV ont été réalisées. Deux études ont montré des déficits de rétention de la tâche (Lazarini et al., 2009; Sultan et al., 2010). De plus, lors de l'expérience de rappel de la tâche, les nouveaux neurones sont préférentiellement activés (Sultan et al., 2010). Ces résultats suggèrent que les nouveaux neurones sont nécessaires à la mémoire de long-terme acquise lors de l'apprentissage associatif. L'expérience la plus frappante montre que lors de l'effacement comportemental de l'association de l'odeur à la récompense, les neurones qui ont participé à cet apprentissage sont éliminés (Sultan, Rey, Sacquet, Mandaïron, & Didier, 2011). Ceci suggère fortement que les nouveaux neurones sélectionnés pour survivre pendant l'apprentissage, sont le support de la mémoire associative. Une autre équipe a montré que l'activation des nouveaux neurones par optogénétique permet de faciliter l'apprentissage d'une tâche d'association d'une odeur à une récompense (Alonso et al., 2012). L'ensemble de ces résultats montre que les cellules granulaires issues de la neurogénèse adulte sont importantes dans l'acquisition de la tâche d'association de l'odeur à une récompense. Plus important encore, elles deviennent le support de la mémoire à long-terme acquise lors de cette tâche. Deux autres études ont montré que le blocage de la neurogénèse adulte de manière génétique et par infusion d'AraC dans la ZSV, n'a pas d'effet sur l'acquisition de la mémoire lors d'un apprentissage associatif (Breton-Provencher, Lemasson, Peralta, & Saghatelian, 2009; Imayoshi et al., 2008). Ceci probablement parce que les paradigmes utilisés dans ces deux études sont des tâche non-



opérantes qui ne sont pas dépendantes de la neurogénèse adulte (Nathalie Mandaïron, Sultan, Nouvian, Sacquet, & Didier, 2011).

La discrimination acquise par l'expérience, l'apprentissage perceptif

L'influence de l'expérience sur la capacité de discrimination est appelée « apprentissage perceptif ». La capacité à discriminer deux odorants très proches peut être acquise par l'exposition chronique à ces odorants. L'infusion locale de NMDA dans le BO mime l'effet de l'exposition chronique aux odorants (Nathalie Mandaïron, Stack, Kiselycznyk, & Linster, 2006) suggérant que le BO est le siège de la plasticité permettant l'apprentissage perceptif. Cette exposition chronique augmente le nombre et modifie la distribution spatiale des nouveaux neurones activés lors de l'exposition aux odorants, ce qui augmente l'inhibition exercée sur les cellules mitrales et permet alors de séparer la perception de deux odorants proches (Nathalie Mandaïron, Didier, & Linster, 2008). De plus, lorsque la neurogénèse adulte est bloquée par l'infusion d'un antimitotique au niveau de la ZSV, l'apprentissage perceptif n'est pas possible (Moreno et al., 2009). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le BO est le site principal de la plasticité induite par l'apprentissage perceptif, et cette plasticité est permise par les cellules granulaires issues de la neurogénèse adulte.

Les cellules granulaires, qui sont générées à l'âge adulte sont extrêmement plastiques. Grâce à leur jeunesse, elles présentent une plasticité inégalée dans le cerveau adulte. Dans cette thèse, je me suis intéressée aux rôles de FMRP et de  $\alpha$ CamKII dans la plasticité extrême de ces "young and excitable" (Doetsch & Hen, 2005) nouveaux neurones associée à l'apprentissage perceptif.

## **Épines dendritiques et traduction locale**

À la suite de cette introduction, voici une revue que nous avons publiée dans le journal médecine sciences au sujet d'un article publié en 2012 : DSCR1 interacts with FMRP and is required for spine morphogenesis and local protein synthesis (Wang, Zhu, Chang, & Min, 2012).





## RÉFÉRENCES

1. Richter CA, Birnbaum LS, Farabolini F, et al. *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* 2007 ; 24 : 199-224.
2. Rubin BS, Soto AM. Bisphenol A: perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol* 2009 ; 304 : 55-62.
3. Trasande L, Attina TM, Blustein J. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *JAMA* 2012 ; 308 : 1113-21.
4. Vandenberg LN, Maffini MV, Wadia PR, et al. Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* 2007 ; 148 : 116-27.
5. Zalko D, Jacques C, Duplan H, et al. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 2011 ; 82 : 424-30.
6. Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 2006 ; 147 : 56-69.
7. Delfosse V, Grimaldi M, Pons JL, et al. Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 14930-5.
8. Pons JL, Labesse G. @TOME-2: a new pipeline for comparative modeling of protein-ligand complexes. *Nucleic Acids Res* 2009 ; 37 : W485-91.
9. Paris F, Balaguer P, Terouanne B, et al. Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2002 ; 193 : 43-9.
10. Okada H, Tokunaga T, Liu X, et al. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Environ Health Perspect* 2008 ; 116 : 32-8.

## NOUVELLE

### Épines dendritiques et traduction locale

#### Zones de convergence des syndromes de Down et de l'X fragile

Laura Daroles, Isabelle Caillé

### Épines dendritiques, traduction locale et déficits intellectuels

Les épines dendritiques sont de petites protrusions des dendrites de certains neurones, sites de réception et d'intégration de signaux synaptiques [11] (→). Elles jouent un rôle clé

dans la fonction synaptique et la plasticité neuronale. Des anomalies de la morphologie des épines ont été décrites dans de nombreux syndromes de déficit intellectuel [1], en particulier, dans le syndrome de Down ou trisomie 21, et le syndrome de l'X fragile, les deux formes de retards mentaux d'origine génétique les plus répandues [12-14].

Les épines dendritiques possèdent une machinerie de traduction qui leur est propre, ce qui permet la traduction locale de certains ARNm à l'échelle synaptique. Ce processus de traduction locale est essentiel aux modifications synaptiques qui sont à la base de l'apprentissage et de la mémoire [2].

(→) Voir la Nouvelle de C. Charrier et F. Polleux, m/s n° 11, novembre 2012, page 911

Des dysfonctionnements de la traduction locale synaptique ont été impliqués dans certaines formes de déficits intellectuels [1]. En particulier, le syndrome de l'X fragile est dû à l'extinction du gène *FMR1* codant pour la *fragile X mental retardation protein* (FMRP). FMRP est un régulateur clé de la traduction locale et son absence provoque des défauts de la traduction de certains ARNm synaptiques entraînant des défauts de plasticité synaptique et de morphogenèse des épines [3,12].

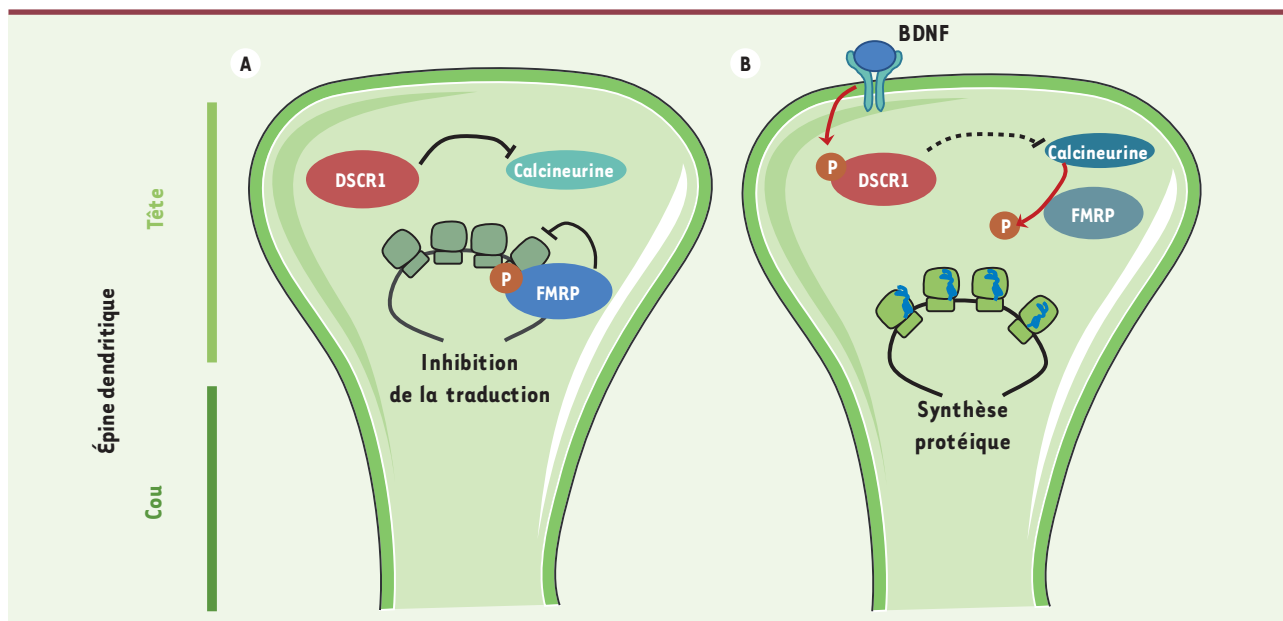
Le syndrome de Down résulte de la présence d'une troisième copie du chromosome 21 dans les cellules, entraînant la surexpression des gènes qu'il porte. Cette maladie se caractérise par des anomalies touchant de nombreux systèmes avec des défauts cognitifs particulièrement marqués. De manière similaire au syndrome de l'X fragile, ces anomalies s'accompagnent de défauts de la morphologie des épines et de la plasticité synaptique [4]. Le gène *DSCR1* (*Down syndrome critical region 1*), localisé sur le chromosome 21, est fortement exprimé dans le cerveau [5].

UMR CNRS 7102, équipe développement et plasticité des réseaux neuronaux, université Pierre et Marie Curie (UPMC), 9, quai Saint Bernard, 75005 Paris, France.  
[laura.daroles@snv.jussieu.fr](mailto:laura.daroles@snv.jussieu.fr)  
[isabelle.caille@snv.jussieu.fr](mailto:isabelle.caille@snv.jussieu.fr)

lisé sur le chromosome 21, est fortement exprimé dans le cerveau [5]. *DSCR1* appartient à la famille des calcipresines, qui inhibent les calcineurines. La surexpression cérébrale de *DSCR1* chez des souris transgéniques induit les caractéristiques comportementales et synaptiques du syndrome de Down, ce qui suggère que *DSCR1* joue un rôle essentiel dans le déficit intellectuel lié à la pathologie [6, 13]. Cependant, jusqu'à récemment, les mécanismes moléculaires liant *DSCR1* au déficit intellectuel demeuraient inconnus. L'article de Wang et al. [7] éclaire ce problème en s'intéressant à la fonction de *DSCR1* dans la morphogenèse des épines et la traduction locale.

### *DSCR1* régule la morphogenèse des épines et interagit avec FMRP

En utilisant des stratégies de perte ou gain de fonction de *DSCR1* dans des neurones en culture ou dans le cerveau de souris transgéniques, les auteurs montrent que *DSCR1* régule la densité



**Figure 1. Modèle de la régulation par DSCR1 de la traduction locale induite par le BDNF via FMRP.** **A.** À l'état basal, DSCR1 inhibe l'activité phosphatase de la calcineurine. PhosphoFMRP inhibe la traduction des ARNm présents au niveau des épines. **B.** Une stimulation par le BDNF induit la phosphorylation de DSCR1, ce qui lève son inhibition sur la calcineurine. Celle-ci, à son tour, déphosphoryle FMRP, levant la répression de FMRP sur la traduction locale.

et la morphologie des épines dendritiques. Une diminution de son expression entraîne une diminution de la densité des épines et de la taille de leur tête. Une augmentation de son expression a l'effet inverse, augmentant la taille de la tête des épines de manière similaire à ce qui est observé dans le syndrome de Down. La cofiline, selon son état de phosphorylation, module la dynamique du cytosquelette d'actine au niveau des épines, ce qui détermine leur taille [8]. Les auteurs observent que le niveau de phosphorylation de la cofiline est corrélé au niveau d'expression de DSCR1. Étant donné que DSCR1 inhibe l'activité de la calcineurine qui, elle-même, déphosphoryle la cofiline, DSCR1 pourrait réguler la morphologie des épines par cette voie. De manière intéressante, la diminution de l'expression de *FMR1* dans des neurones surexprimant *DSCR1* suffit à rétablir un phénotype sauvage de la morphologie des épines et le niveau de phosphorylation de la cofiline *in vitro* et *in vivo*. Il y a donc une interaction fonctionnelle entre DSCR1 et FMR1.

Les auteurs montrent ensuite, par des expériences d'immunoprécipitation à partir de cellules transfectées et en utilisant le FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) dans des neurones en culture, qu'il existe bien une interaction entre DSCR1 et FMRP, qui semble limitée à la forme phosphorylée de FMRP, forme active pour l'inhibition de la traduction locale.

### DSCR1 régule la traduction locale dendritique

Pour tester l'implication de DSCR1 dans la traduction locale et visualiser en temps réel la traduction locale d'un ARN donné au niveau d'une épine unique, les auteurs utilisent un rapporteur de traduction photosensible dans des neurones en culture. Ce « rapporteur » est la protéine fluorescente dendra2 entourée des régions 3' et 5' non traduites de l'ARNm de CamKII $\alpha$  (sous-unité  $\alpha$  de la kinase dépendante de la calcium/calmoduline II), un ARNm transporté dans les dendrites et dont la traduction locale est régulée par FMRP et activée par l'application de BDNF (*brain derived*

*neurotrophic factor*) [9]. Dans des neurones contrôles, l'étiquette est traduite au niveau des épines après stimulation par le BDNF. En revanche, cette traduction locale du rapporteur ne peut être induite dans des neurones *DSCR1*<sup>-/-</sup> et elle est au contraire augmentée dans des neurones surexprimant *DSCR1*. Ceci suggère que DSCR1 est nécessaire à la traduction locale de CamKII $\alpha$ . Enfin, les résultats d'expériences biochimiques *in vitro* conduisent les auteurs à proposer un modèle mécanistique liant DSCR1 et FMRP dans la régulation de la traduction locale (Figure 1). Dans ce modèle, le BDNF induit la phosphorylation de DSCR1 et une augmentation de l'activité de la calcineurine qui, en déphosphorylant FMRP, permet la levée de son inhibition sur la traduction. Ce modèle moléculaire novateur devra maintenant être confirmé par des expériences testant ces interactions *in vivo*.

### Conclusions

Cette étude met donc en évidence un nouveau rôle de DSCR1 comme régulateur de la morphogenèse des épines et



de la traduction locale dendritiques, en interaction avec FMRP. Les syndromes de l'X fragile et de Down partageraient donc des troubles affectant les mêmes voies de signalisation, celles qui régulent la morphologie des épines dendritiques et la synthèse protéique locale.

Ces données s'inscrivent dans un contexte où les dérégulations de la traduction locale synaptique associées à une dysmorphogenèse des épines apparaissent au cœur de la physiopathologie des déficits intellectuels et de l'autisme [1]. Récemment, il a été montré que des souris modèles du déficit intellectuel associé à la sclérose tubéreuse (souris *Tsc2*<sup>+/-</sup>) montraient une dérégulation de la traduction locale synaptique qui pouvait être corrigée si l'on croisait ces souris avec des souris *FMR1*<sup>+/-</sup> [10]. De manière similaire à ce que décrit l'étude de Wang *et al.* [7] pour les syndromes de l'X fragile et de Down, ce résultat suggère donc l'intersection des voies de signa-

lisation dérégulées dans le syndrome de l'X fragile et la sclérose tubéreuse. Ce modèle unifié de physiopathologie synaptique est susceptible d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques visant à restaurer des niveaux normaux de traduction locale chez les patients [1, 10]. ♦

### Dendritic spines and local protein synthesis contribute to Down and fragile X syndromes

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Troca-Marin JA, Alves-Sampaio A, Montesinos ML. Deregulated mTOR-mediated translation in intellectual disability. *Prog Neurobiol* 2012 ; 96 : 268-82.
2. Wang DO, Martin KC, Zukin RS. Spatially restricting gene expression by local translation at synapses. *Trends Neurosci* 2010 ; 33 : 173-82.
3. Bassell GJ, Warren ST. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* 2008 ; 60 : 201-14.
4. Contestabile A, Benfenati F, Gasparini L. Communication breaks-Down: from neurodevelopment defects to

cognitive disabilities in Down syndrome. *Prog Neurobiol* 2010 ; 91 : 1-22.

5. Fuentes JJ, Genesca L, Kingsbury TJ, *et al.* DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Hum Mol Genet* 2000 ; 9 : 1681-90.
6. Dierssen M, Arque G, McDonald J, *et al.* Behavioral characterization of a mouse model overexpressing DSCR1/RCAN1. *PLoS One* 2011 ; 6 : e17010.
7. Wang W, Zhu JZ, Chang KT, Min KT. DSCR1 interacts with FMRP and is required for spine morphogenesis and local protein synthesis. *EMBO J* 2012 ; 31 : 3655-66.
8. Cingolani LA, Goda Y. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci* 2008 ; 9 : 344-56.
9. Aakalu G, Smith WB, Nguyen N, *et al.* Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* 2001 ; 30 : 489-502.
10. Auerbach BD, Osterweil EK, Bear MF. Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature* 2011 ; 480 : 63-8.
11. Charrier C, Polleux F. Rôle de la duplication partielle du gène SRGAP2 dans l'évolution et le développement du cerveau humain. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 911-4.
12. Billuart P, Chelly J, Gilgenkrantz S. Retards mentaux liés à l'X. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 947-53.
13. Delabar JM. Syndrome de Down : nouvelles perspectives thérapeutiques ? *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 371-6.
14. Turleau C, Vekemans M. Trisomie 21 : 50 ans entre médecine et science. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 267-72.

## NOUVELLE

### Rôle du locus H19 dans le placenta

Paul Monnier, Luisa Dandolo

Institut Cochin, Département de génétique et développement,  
24, rue Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.  
[luisa.dandolo@inserm.fr](mailto:luisa.dandolo@inserm.fr)

► Le gène *H19* produit un ARN non codant fortement exprimé au cours du développement embryonnaire. Découvert il y a plus de 20 ans [1, 11], il fut, avec le gène voisin *Igf2* (*insulin-like growth factor 2*), parmi les premiers gènes décrits comme étant soumis à l'empreinte parentale [2, 3], mécanisme épigénétique qui conduit à une expression monoallélique de ces gènes, dépendante de l'origine parentale de l'allèle. Le gène *H19* est ainsi exclusivement exprimé à partir de l'allèle hérité

de la mère. De fait, ce locus *H19-Igf2* a servi de modèle à la compréhension de ce mécanisme épigénétique d'empreinte parentale qui touche environ une centaine de gènes chez l'homme et la souris.

### Rôle du gène H19 dans le développement embryonnaire et la tumorigenèse

En dépit du nombre important d'études portant sur ce locus, la fonction précise du gène *H19* reste à ce jour encore mal comprise. Il est, chez l'homme, asso-

cié aux syndromes de Beckwith-Wiedemann et de Silver-Russell [12], qui sont des syndromes respectivement de surcroissance somatique et de retard de croissance intra-utérin [4]. Il fut également montré *in vivo* chez la souris que le gène *H19* joue un rôle de suppresseur de tumeur [5]. Enfin, toujours chez la souris, une étude a montré que ce gène régule la croissance embryonnaire en contrôlant, par un mécanisme en *trans*, l'expression d'un réseau de gènes soumis à empreinte parentale (IGN, *imprinted*



## **Résultats**





## **1. FMRP et la traduction locale de $\alpha$ CamKII sont nécessaires à la plasticité structurelle induite par l'apprentissage olfactif.**

### **1.1 Résumé de l'article**

Le but de notre étude a été de comprendre le rôle de la protéine FMRP dans la plasticité structurelle des nouveaux neurones du BO, les cellules granulaires en réponse à l'apprentissage. Pour cela nous avons choisi d'utiliser un apprentissage perceptif qui dépend de la neurogénèse adulte dans le BO (Moreno et al., 2009). À cet apprentissage, nous avons soumis des souris *Fmr1* cKO (cKO), dans lesquelles l'ablation du gène *Fmr1* peut être induite dans les cellules souche neurales et leur progéniture par des injections répétées de tamoxifène. Après ces injections, les souris ont été injectées par stéréotaxie avec un lentivirus porteur de la GFP dans la ZSV de façon à pouvoir observer la morphologie des neurones. Après apprentissage perceptif, nous avons alors pu observer que chez les souris contrôles (control cKO), l'apprentissage perceptif induit plusieurs modifications morphologiques des cellules granulaires nouvellement générées au niveau dendritique et au niveau des épines. En revanche, les souris cKO ne parviennent pas à apprendre et aucune modification morphologique des cellules granulaires observées chez les control cKO n'est observable. Ces résultats suggèrent donc que FMRP est nécessaire dans les nouveaux neurones à l'apprentissage perceptif et aux modifications structurelles associées. Nous avons ensuite tenté de sauver les défauts d'apprentissage et de plasticité en traitant les souris cKO avec un antagoniste des récepteurs mGluR5. Ce traitement a effectivement restauré la capacité d'apprentissage et la plasticité structurelle dendritique. Ceci indique que cet apprentissage et la plasticité structurelle associée dépend de l'activation des mGluR. Une des cibles de FMRP impliquée dans la plasticité synaptique et structurelle est la protéine  $\alpha$ CamKII. Afin de tester le rôle de sa traduction dans l'apprentissage perceptif, nous avons utilisé des souris dans lesquelles l'ARNm de  $\alpha$ CamKII n'est pas transporté dans les dendrites. Nous avons pu observer que ces souris présentent les mêmes défauts d'apprentissage et de plasticité structurelle que les souris cKO. De plus, grâce à

l'utilisation *in vivo* d'un rapporteur de traduction de  $\alpha$ CamKII chez des souris sauvages et des souris mutantes *Fmr1* KO soumises ou non à l'apprentissage, nous avons pu observer une augmentation de l'expression dendritique après apprentissage en condition sauvage. Chez les souris KO, l'expression de la GFP à l'état basal est déjà augmentée par rapport aux sauvages et l'apprentissage diminue cette expression. Ceci suggère que l'apprentissage induit une augmentation de la traduction dendritique de  $\alpha$ CamKII de manière FMRP dépendante. En absence de FMRP cette traduction est plus élevée en condition basale, ce qui est en accord avec une suractivation de la traduction locale en aval de la signalisation mGluR (Bear et al., 2004).

L'ensemble de nos résultats montre le rôle de FMRP dans la plasticité structurelle des nouveaux neurones du BO associée à l'apprentissage olfactif et suggère que FMRP permettrait cette plasticité grâce à la régulation de la traduction locale de  $\alpha$ CamKII.

**1.2 L'article : FMRP and Dendritic Local Translation of the  $\alpha$  CamKII mRNA Are Required for the Structural Plasticity Underlying Olfactory Learning.**

*Laura Daroles, Simona Gribaudo, Mohamed Doulazmi, Sophie Scotto-Lomassese, Caroline Dubacq, Nathalie Madaïron, Charles August Greer, Anne Didier, Alain Trembleau, and Isabelle Caillé. Biol Psychiatry. PMID:26372002*



## Fragile X Mental Retardation Protein and Dendritic Local Translation of the Alpha Subunit of the Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase II Messenger RNA Are Required for the Structural Plasticity Underlying Olfactory Learning

Laura Daroles, Simona Gribaudo, Mohamed Doulazmi, Sophie Scotto-Lomassese, Caroline Dubacq, Nathalie Mandaïron, Charles August Greer, Anne Didier, Alain Trembleau, and Isabelle Caillé

### ABSTRACT

**BACKGROUND:** In the adult brain, structural plasticity allowing gain or loss of synapses remodels circuits to support learning. In fragile X syndrome, the absence of fragile X mental retardation protein (FMRP) leads to defects in plasticity and learning deficits. FMRP is a master regulator of local translation but its implication in learning-induced structural plasticity is unknown.

**METHODS:** Using an olfactory learning task requiring adult-born olfactory bulb neurons and cell-specific ablation of FMRP, we investigated whether learning shapes adult-born neuron morphology during their synaptic integration and its dependence on FMRP. We used alpha subunit of the calcium/calmodulin-dependent kinase II ( $\alpha$ CaMKII) mutant mice with altered dendritic localization of  $\alpha$ CaMKII messenger RNA, as well as a reporter of  $\alpha$ CaMKII local translation to investigate the role of this FMRP messenger RNA target in learning-dependent structural plasticity.

**RESULTS:** Learning induces profound changes in dendritic architecture and spine morphology of adult-born neurons that are prevented by ablation of FMRP in adult-born neurons and rescued by a metabotropic glutamate receptor 5 antagonist. Moreover, dendritically translated  $\alpha$ CaMKII is necessary for learning and associated structural modifications and learning triggers an FMRP-dependent increase of  $\alpha$ CaMKII dendritic translation in adult-born neurons.

**CONCLUSIONS:** Our results strongly suggest that FMRP mediates structural plasticity of olfactory bulb adult-born neurons to support olfactory learning through  $\alpha$ CaMKII local translation. This reveals a new role for FMRP-regulated dendritic local translation in learning-induced structural plasticity. This might be of clinical relevance for the understanding of critical periods disruption in autism spectrum disorder patients, among which fragile X syndrome is the primary monogenic cause.

**Keywords:** Adult neurogenesis, Fragile X mental retardation protein, Learning, Local translation, Olfactory bulb, Structural plasticity

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.023>

In the adult brain, the plasticity involved in learning and memory includes modifications of the strength of existing synapses, as well as structural plasticity allowing the gain or loss of synapses (1). Although local dendritic messenger RNA (mRNA) translation is a major determinant of the synaptic plasticity underlying learning and memory (2), its role in structural plasticity remains unclear. Data pointing to its role in activity-induced structural plasticity stem from animal models deficient for the fragile X mental retardation protein (FMRP). Fragile X syndrome (FXS), the most common monogenic form of intellectual disability (3), and autism spectrum disorder (ASD) result from the absence of FMRP due to the

silencing of the *FMR1* gene (4). FMRP is an RNA-binding protein expressed in neurons and a key regulator of the local dendritic mRNA translation associated with synaptic plasticity (5). In addition, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice display disrupted critical periods of experience-dependent plasticity in the somatosensory and visual cortex (6,7) and increased spine instability and insensitivity to environmental changes (8–10). This suggests a role for FMRP in experience-dependent structural plasticity, but direct cell-specific demonstrations of the role of FMRP in learning-induced structural plasticity are lacking.

The olfactory system expresses significant functional and structural plasticity, including the integration of new neurons

into the adult olfactory bulb (OB). We previously showed that the morphological differentiation of new neurons in the adult OB is regulated by FMRP (11). We also demonstrated that olfactory activity regulates the dendritic transport and translation of the  $\alpha$  subunit of the calcium/calmodulin-dependent kinase II ( $\alpha$ CaMKII) mRNA, one of FMRP's translational mRNA targets and a major player in synaptic plasticity (12). However, how learning shapes the morphology of new neurons in the OB during their integration into circuits and whether FMRP and  $\alpha$ CaMKII mRNA local translation play a role in learning-induced structural plasticity is unknown.

Using genetic tools and animal models, we show that olfactory perceptual learning induces profound morphological changes in adult-born neurons with an increase in dendritic complexity, spine density, and modifications of spine morphology. FMRP deficiency in new neurons leads to learning deficits and defects in associated structural modifications. Interestingly, these defects are rescued by the metabotropic glutamate receptor 5 antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine (MPEP), tested in clinical trials for FXS (13,14). In addition, learning induces FMRP-dependent increases of  $\alpha$ CaMKII mRNA local translation in dendrites of adult-born neurons, which is necessary for learning and associated structural plasticity.

Collectively, our results reveal a molecular cascade by which FMRP regulation of  $\alpha$ CaMKII local translation mediates structural plasticity of adult-born neurons underlying olfactory learning. This highlights a new role of dendritic local translation in learning-induced structural plasticity, necessary for dendrite morphogenesis and spinogenesis, which might be of clinical relevance for understanding disrupted critical periods in ASD patients (15–17).

## METHODS AND MATERIALS

### Animals

Two-month-old male mice were housed in a 12-hour light/dark cycle, in cages containing two to six individuals. Animal care was conducted in accordance with standard ethical guidelines (National Institutes of Health publication no. 85-23, revised 1985 and European Committee Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals 86/609/EEC). The experiments were approved by the local ethics committee (Comité d'Éthique en Expérimentation Animale Charles Darwin C2EA-05). All mouse lines were in a C57BL6 background. *Fmr1* knockout (KO) and conditional knockout (cKO) mice (1), Nestin::CreERT2 mice (2), and  $\alpha$ CaMKII 3' untranslated region (UTR) mutant mice (3) were genotyped according to the original protocols.

### Perceptual Learning

During 10 days, mice were exposed daily to swabs with 100  $\mu$ L of pure limonene+ (Lim+) or limonene– (Lim–) in two tea balls in the home cage for 1 hour.

### Discrimination Test

To assess discrimination between Lim+ and Lim–, mice were subjected to a habituation/dishabituation test. After an initial 50-second presentation of mineral oil, the habituation phase

consisted of four consecutive 50-second presentations of the same odorant, allowing 5-minute intervals, followed by a 50-second presentation of a second odorant (test). Odorants diluted to 1 Pa vapor pressure in mineral oil were presented on a swab in a tea ball. Investigation time was recorded as active sniffing within 1 cm from the tea ball. The investigator was blind regarding the genotype of animals during the tests.

### Supplemental Information

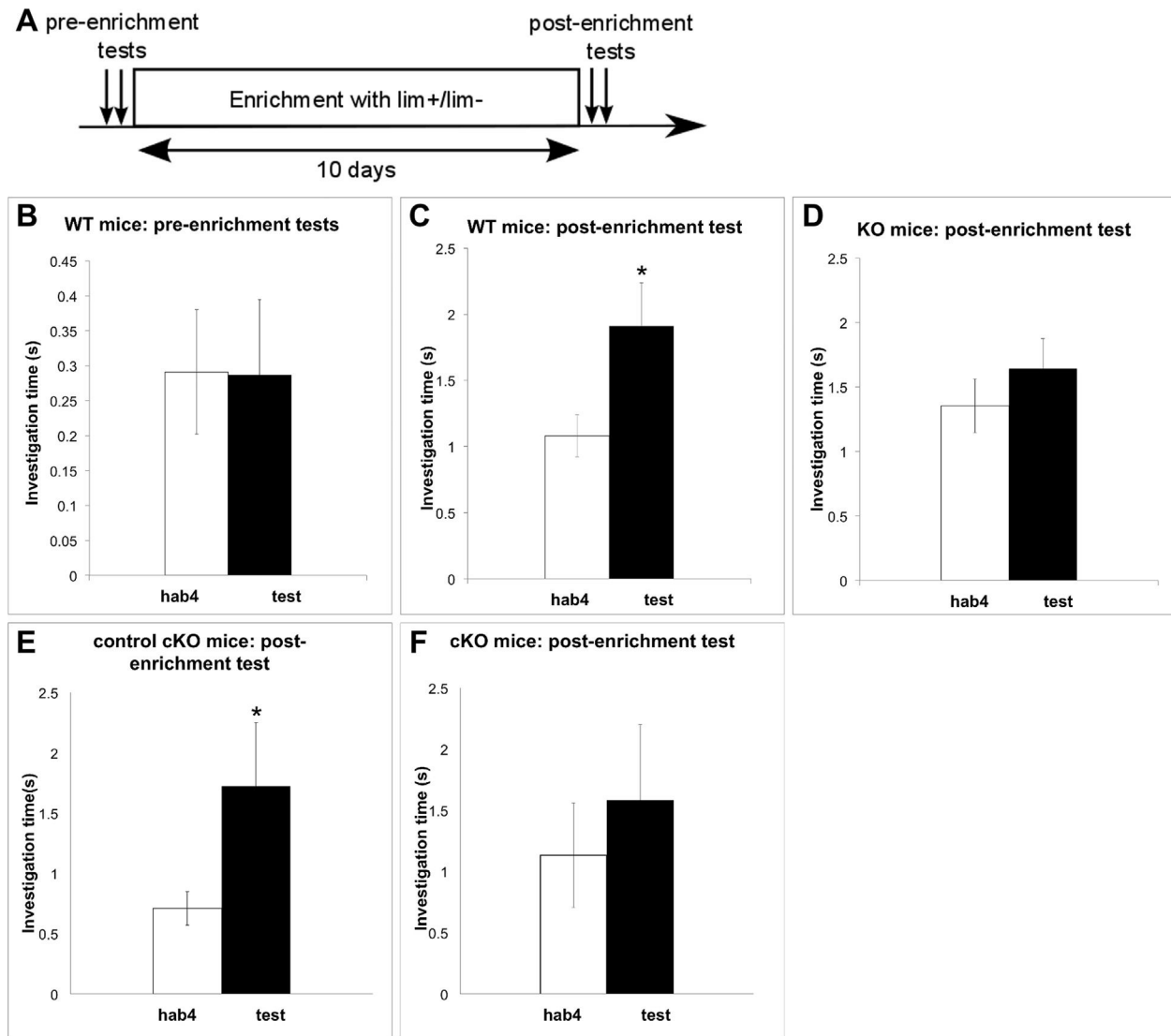
See Supplement 1 for stereotaxic injections, histology, image analysis, tamoxifen and MPEP administration and statistical analysis sections.

## RESULTS

### FMRP in Adult-Born Neurons Is Necessary for Olfactory Perceptual Learning

To investigate the role of FMRP in learning-induced structural modifications of new OB neurons, we used an olfactory perceptual learning paradigm in which mice learn to discriminate two perceptually similar odorants, Lim+ and Lim–. Importantly, this learning paradigm depends on OB plasticity (18) and requires adult neurogenesis in the OB (19). Naive wild-type (WT) mice cannot discriminate Lim+ from Lim–, as tested by a habituation/dishabituation test (four habituation trials with one member of the pair followed by a test trial with the other member; Figure 1B; Figure S1A in Supplement 1). The significant decrease in investigation times from the first habituation trial (hab1) to the fourth habituation trial (hab4) (Figure S1A in Supplement 1) shows that the mice habituate to one odorant of the pair. The stable investigation time between hab4 and test shows that naive mice cannot discriminate Lim+ from Lim– (Figure 1B). Subsequently, the learning phase includes a 10-day enrichment period, where mice are exposed 1 hour per day to both odorants simultaneously (Figure 1A). After this enrichment period, mice are tested again for their capacity to discriminate Lim+ from Lim– through a habituation/dishabituation test (Figure 1C; Figure S1B in Supplement 1). As in the pre-enrichment tests, mice habituate properly (Figure S1A in Supplement 1). However, the significant difference in investigation times between hab4 and test (Figure 1C) shows that WT mice can now discriminate Lim+ from Lim–, as previously described (19). In contrast, *Fmr1*<sup>–/y</sup> mice (20) did not learn to discriminate the two odorants after a 10-day enrichment period (Figure 1D; Figure S1C in Supplement 1). This was not due to a general olfactory discrimination defect of the KO mice, since they spontaneously discriminated two perceptually distinct odorants (octanal/carvone; Figure S1D in Supplement 1) and as previously described (21). This suggests that FMRP is necessary for the perceptual learning underlying discrimination of similar odorants.

To assess the role of FMRP selectively in new neurons, we used genetically modified Nestin::CreERT2/*Fmr1*<sup>fllox/y</sup> mice (20,22) (hereafter called cKO mice), in which *Fmr1* ablation can be induced in adult-born neuron progenitors and their progeny through Cre activation with tamoxifen (Figure 2A). In our conditions, tamoxifen induces *Fmr1* ablation in 37% of new OB neurons in the cKO mice ( $p < .0001$  Fisher exact test;

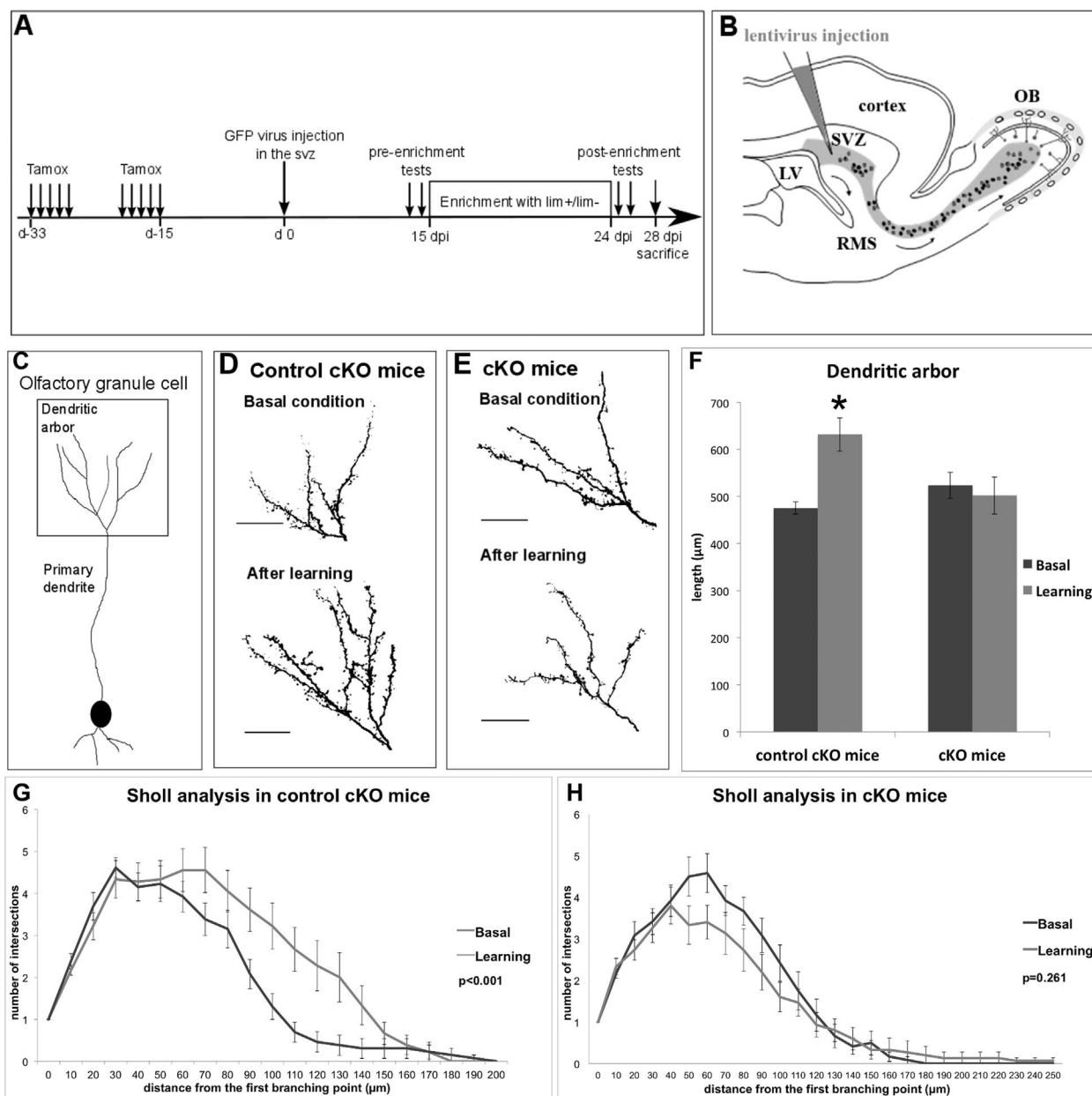


**Figure 1.** (A) Design of the olfactory perceptual learning paradigm. Spontaneous discrimination between limonene+ (Lim+) and limonene- (Lim-) was tested through habituation/dishabituation tests before and after an odor enrichment period. Experimental groups were enriched by introducing lim+ and lim- into the home cage for 1-hour periods over 10 days. (B) Before the enrichment period, wild-type (WT) mice cannot discriminate Lim+ from Lim-. They do not spend more time investigating the test odor than the habituation odor ( $p = .735$  with a Wilcoxon paired test,  $n = 10$ ). (C, E) After the enrichment period, WT (C) and control conditional knockout (cKO) mice (E) can discriminate lim+ from lim-, indicating perceptual learning. They spend significantly more time investigating the test odor than the habituation odor. ([C]  $p = .004$ ,  $n = 10$ ; [E]  $p = .035$ ,  $n = 9$ , with unilateral paired Student  $t$  test). (D, F) After the enrichment period, *Fmr1* knockout (KO) (D) and cKO mice (F) cannot discriminate Lim+ from Lim-. They do not spend more time investigating the test odor than the habituation odor ([D]  $p = .213$ , [F]  $p = .674$ , with a Wilcoxon paired test,  $n = 10$ ). Data are expressed as mean values  $\pm$  SEM. hab4, investigation time of the habituation odor during the fourth trial of habituation; test, investigation time of test odor (the other odorant of the pair).

Figure S1G-I in Supplement 1). cKO mice injected with tamoxifen did not learn to discriminate Lim+ from Lim- after the enrichment period (Figure 1F; Figure S1F in Supplement 1). In contrast, tamoxifen-injected control cKO mice not carrying the Cre allele discriminated Lim+ from Lim- after the 10-day enrichment period (Figure 1E; Figure S1E in Supplement 1). Decreased neurogenesis in the adult hippocampus of the cKO mice was previously reported (23). While this is unlikely to affect olfactory perceptual learning, which relies on OB mechanisms (18), it was important to verify that *Fmr1* mutation did not alter OB adult neurogenesis, which could explain the

observed learning deficit. Control cKO and cKO mice were BrdU-injected and the number of BrdU-positive (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) OB neurons in the granule cell layer after learning was quantified. There was Sigma Aldrich 5-bromo-2'-deoxyuridine no significant difference in the density of BrdU-positive OB neurons between control cKO and cKO mice (control cKO:  $222 \pm 27$  cells/mm<sup>2</sup>; cKO:  $261 \pm 28$  cells/mm<sup>2</sup>;  $n = 4$  mice/group; Kruskal-Wallis test,  $p = .622$ ) showing that OB neurogenesis is not affected in cKO mice. The learning deficit in cKO mice thus suggests that FMRP in new neurons is necessary for olfactory perceptual learning.





**Figure 2.** (A) Time line of the experiment. Adult mice (conditional knockout [cKO]: Nestin::CreERT2/*Fmr1*<sup>flx/y</sup>) were injected with tamoxifen (Tamox) to induce *Fmr1* mutation in Nestin positive progenitor cells and their progeny. Control mice (control cKO) were control littermates lacking the Cre allele. A green fluorescent protein (GFP)-expressing lentivirus was injected into their subventricular zone (SVZ). Mice were exposed to the enrichment period during the integration of the labeled new neurons in the olfactory bulb (OB) and tested for perceptual learning before sacrifice. (B) Scheme of a sagittal section of the mouse forebrain. The SVZ of the lateral ventricle (LV) continuously produces new neurons, which migrate along the rostral migratory stream (RMS) and differentiate as interneurons in the OB. Subpopulations of young neurons can be labeled through stereotaxic injections of GFP-expressing viruses into the SVZ, which allow their morphological analysis. (C) Scheme of a newly formed granule cell (GC) of the OB. GCs are anaxonic gamma-aminobutyric acidergic interneurons with a long apical dendrite branching out into a dendritic arbor. (D, E) Representative binarized pictures of the dendritic arbors of GFP-labeled new GCs in basal conditions or after perceptual learning in control cKO mice (D) and in cKO mice (E). Scale bars: 40  $\mu$ m. (F) Dendritic arbor length of new GCs in control cKO or cKO mice in basal or learning conditions. Perceptual learning induces a lengthening of the dendritic arbor of new neurons in control cKO mice ( $p = .014$ ) but not in cKO mice ( $p = .99$ ). (Two-way analysis of variance [ANOVA]: genotype effect,  $F_{1,47} = 1.247$ ,  $p = .271$ ; learning effect,  $F_{1,47} = 4.43$ ,  $p = .039$ ; genotype-learning interaction,  $F_{1,47} = 6.13$ ,  $p = .0170$ , followed by least significant difference post hoc test,  $n = 11, 14, 13, 13$ ).  $^*p < .05$ , statistical significance. (G) Sholl analysis of the dendritic complexity of new GCs in control cKO mice. The origin of the concentric radii was set at the first branching point of the apical dendrite. New GCs display significantly increased complexity after learning compared with basal conditions (repeated-measures ANOVA with two factors:  $F_{1,25} = 6.92$ ,  $p < .001$ , followed by Bonferroni post hoc test,  $n = 13, 17$ ). (H) Sholl analysis of the dendritic complexity of new GCs in cKO mice. New GCs display similar complexity in basal or learning conditions (repeated-measures ANOVA with two factors:  $F_{1,24} = 1.324$ ,  $p = .261$ ,  $n = 12, 15$ ). d, day; dpi, days postinjection.

### FMRP in Adult-Born Neurons Is Necessary for Learning-Induced Structural Modifications of New Neurons

We next asked if the learning deficit in cKO mice could be related to defects in new neuron learning-induced structural plasticity. To analyze this, we labeled a cohort of newly generated OB neurons in control cKO or cKO mice by injecting a green fluorescent protein (GFP)-expressing lentivirus in the subventricular zone, where new OB neurons originate (Figure 2A,B). Injected mice were subjected, or not, to learning. In the learning paradigm, enrichment took place during integration of the labeled new neurons into the OB synaptic circuits (15 to 24 days postinjection; Figure 2A). The mice were subsequently sacrificed and the morphology of OB GFP-labeled granule cells (GCs) was analyzed (11). GCs are anaxonic gamma-aminobutyric acidergic interneurons, whose cell body is localized in the granule cell layer and a long, branching and spiny apical dendrite arborizes in the external plexiform layer (scheme Figure 1C,2C). In our analyses, we considered only GFP-positive GCs with a fully developed dendritic arbor contained entirely within the sections. This allowed us to check FMRP immunoreactivity in cell bodies of analyzed neurons and to avoid underestimating the total dendritic length. The length of the primary dendrite extending from the cell body to the first branching point did not vary in the different conditions analyzed in this study (not shown, unpaired Student *t* test  $p = .156$ ,  $n = 45, 72$ ). The length of the dendritic arbor after the first branching point was  $475 \pm 13 \mu\text{m}$  for control cKO mice in basal conditions. After learning, the length increased significantly to  $637 \pm 45 \mu\text{m}$  (Figure 2D,F). Learning also induced an increase in the complexity of the apical dendritic arbor, as evidenced by Sholl analysis (Figure 2D,G). In comparison with control cKO mice under basal conditions, apical dendritic arbors of FMRP-depleted (FMRP<sup>-</sup>) new neurons in cKO mice displayed a similar length ( $523 \pm 28 \mu\text{m}$ ; Figure 2E) and dendritic complexity (repeated-measures analysis of variance with two factors;  $F_{1,23} = .985$ ,  $p = .331$ ,  $n = 13\text{--}14$ ; Figure 2G,H). However, in contrast to control cKO mice, the learning paradigm did not induce any change in the dendritic arbor length ( $510 \pm 41 \mu\text{m}$ ; Figure 2E,F) or complexity in FMRP<sup>-</sup> neurons of cKO mice (Figure 2H). These data strongly suggest that FMRP in new neurons is necessary for learning-induced dendritic remodeling.

We analyzed spine density by counting protrusions in the dendritic arbor of labeled GCs. In control cKO mice, the spine density in basal conditions was  $.45 \pm .02 / \mu\text{m}$  and was significantly increased to  $.6 \pm .02 / \mu\text{m}$  following learning (Figure 3A,A'',B), consistent with the notion that learning induced the formation of new spines and/or increased spine stabilization. As we already observed in similar conditions (11), spine density in FMRP<sup>-</sup> neurons from cKO mice in basal conditions was significantly increased compared with control cKO mice ( $.55 \pm .04 / \mu\text{m}$  versus  $.45 \pm .02 / \mu\text{m}$ ;  $p = .02$ ; Figure 3A,A'',B). However, importantly, learning did not change spine density in FMRP<sup>-</sup> new neurons ( $.57 \pm .05 / \mu\text{m}$ ; Figure 3A',A''',B). This suggests that an increase in spine density does not occur in FMRP<sup>-</sup> neurons either because FMRP is necessary for an increase in spine density or because

the maximum level of spine density is already attained in mutated neurons.

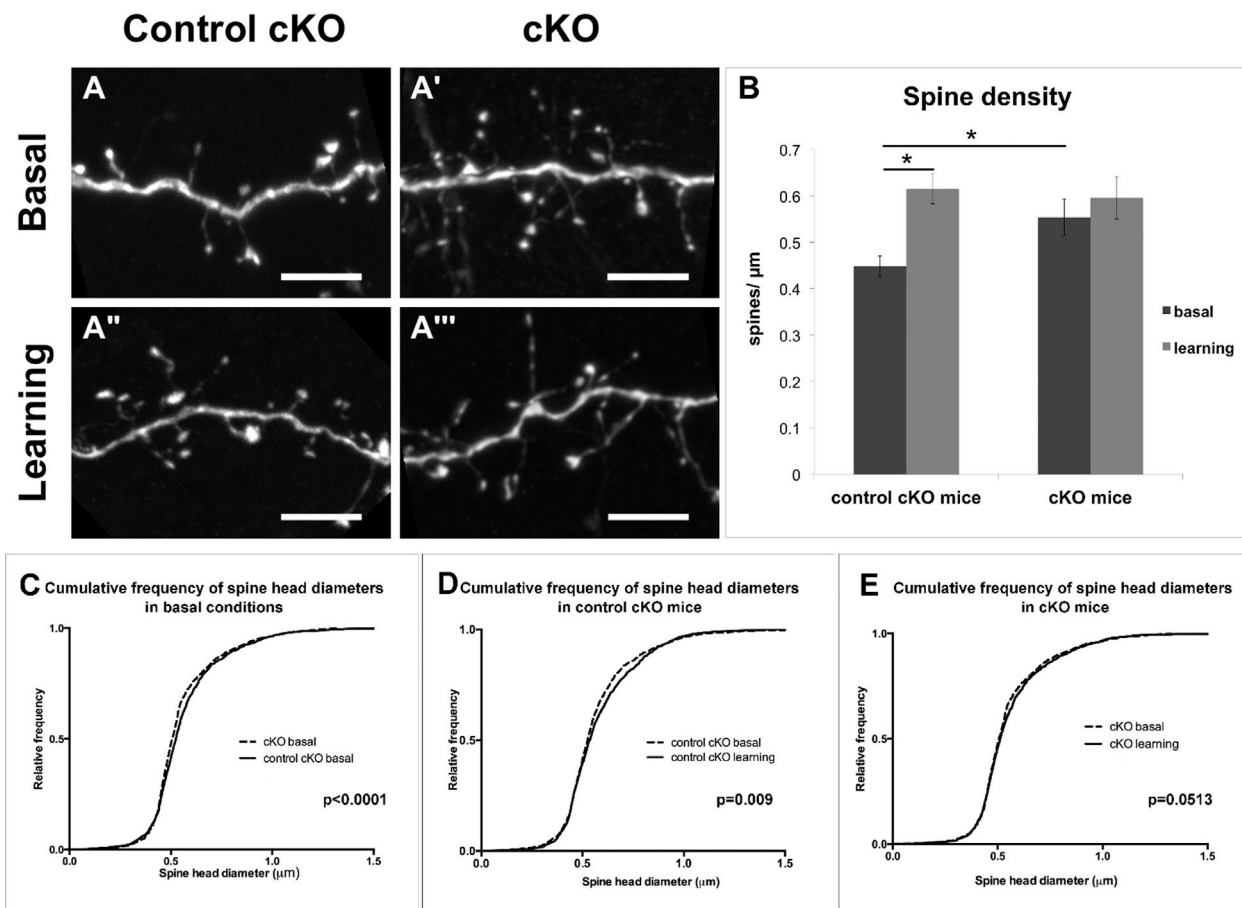
We also analyzed spine length, and as we observed before in similar conditions (11), spines of FMRP<sup>-</sup> new neurons from cKO mice are significantly longer than spines of neurons from control cKO mice (control cKO  $2.84 \pm .06 \mu\text{m}$  versus cKO  $3.09 \pm .09 \mu\text{m}$ ,  $p = .032$ ). However, learning had no effect on spine length, independent of the genotype ( $p = .444$ ).

GC spines display atypical morphologies with a long neck and variable head diameters (Figure 3A-A'''). We thus decided not to follow the typical categorization of mushroom, stubby, and thin spines but to calculate the cumulative frequency distribution of their head diameters. cKO mice were significantly different from control cKO mice with a shift toward smaller diameters (Figure 3C), consistent with what is classically described for *Fmr1* mutated neurons. Learning triggered a significant shift toward larger diameters in wild-type new neurons from control cKO mice (Figure 3D; Figure 3A,A'''). This increased size of spine heads, in other systems, is interpreted as a reflection of a stabilized synapse consecutive to learning (1). However, learning had no significant effect on spines from FMRP<sup>-</sup> new neurons of cKO mice (Figure 3E; Figure 3A',A''').

Collectively, the data suggest that FMRP is necessary for olfactory learning-induced structural plasticity of new neurons by regulating both dendritic and spine structural plasticity.

### MPEP Rescues Learning and Dendritic Arbor Structural Plasticity Defects in Mutated Adult-Born Neurons

In the absence of FMRP, signaling through group 1 metabotropic glutamate receptors (mGluRs) is increased and insensitive to stimulation (24). Consequently, many therapeutic strategies for FXS are based on targeting the mGluR pathway (13,14). We thus asked whether FMRP<sup>-</sup> neuron phenotype could be rescued by a group 1 metabotropic receptor antagonist, MPEP. cKO mice were injected with MPEP (20 mg/kg/day) or saline daily during the period of enrichment. Saline-injected cKO mice could not learn the discrimination task (Figure 4A; Figure S2A in Supplement 1). Remarkably, MPEP injections rescued the learning defects in cKO mice (significant difference between *hab4* and test; Figure 4B; Figure S2B in Supplement 1). To test if this was the consequence of a rescued structural plasticity, we analyzed the morphology of new neurons in saline or MPEP-injected cKO mice after learning. In MPEP-injected cKO mice, new FMRP<sup>-</sup> neurons displayed a lengthened dendritic arbor when compared with saline-injected cKO mice (Figure 4C,D). In addition, FMRP<sup>-</sup> new neurons from MPEP-injected cKO mice displayed an increased dendritic complexity as compared with neurons from saline-injected cKO mice (Figure 4C,E). Comparison of FMRP<sup>-</sup> new neurons from MPEP-injected cKO mice after learning with wild-type neurons in control cKO mice after learning (Figure 2E,G) showed that following MPEP injections, the dendritic lengths and complexity of mutated neurons were similar to their wild-type counterparts ( $p > .05$ ). Thus, MPEP can rescue dendritic arbor structural plasticity defects in mutated neurons. In contrast, spine density (Figure 4F) and morphology (Figure 4G) were unchanged in MPEP-injected cKO mice, as compared with saline-injected cKO mice.



**Figure 3.** (A–A'') Representative pictures showing spines of the dendritic arbor of green fluorescent protein-labeled new granule cells in control conditional knockout (cKO) or cKO mice in basal or learning conditions. Scale bars: 5  $\mu$ m. (B) Spine density in the dendritic arbors of new granule cells in control cKO and cKO mice in basal or learning conditions. Perceptual learning induces an increase in spine density in control cKO mice ( $p = .001$ ) but not in cKO mice ( $p = .941$ ) (two-way analysis of variance: genotype effect,  $F_{1,50} = .791$ ,  $p = .378$ ; learning effect,  $F_{1,47} = 4.27$ ,  $p = .045$ ; genotype-learning interaction,  $F_{1,50} = 6.13$ ,  $p = .023$  followed by least significant difference post hoc test,  $n = 14, 14, 10, 17$ ). \* $p < .05$ . (C) Cumulative frequency distribution of spine head diameters of new neurons from control cKO and cKO mice in basal condition. The absence of fragile X mental retardation protein in new neurons from cKO mice induces a significant shift toward smaller diameters, as compared with control cKO mice (Kolmogorov-Smirnov test,  $p < .0001$ ). (D, E) Cumulative frequency distribution of spine head diameters of new neurons from control cKO (D) and cKO (E) mice with or without learning. Learning induces a significant shift toward larger diameters in control cKO mice (Kolmogorov-Smirnov test,  $p = .009$ ), which is not significant in cKO mice (Kolmogorov-Smirnov test,  $p = .0513$ ).

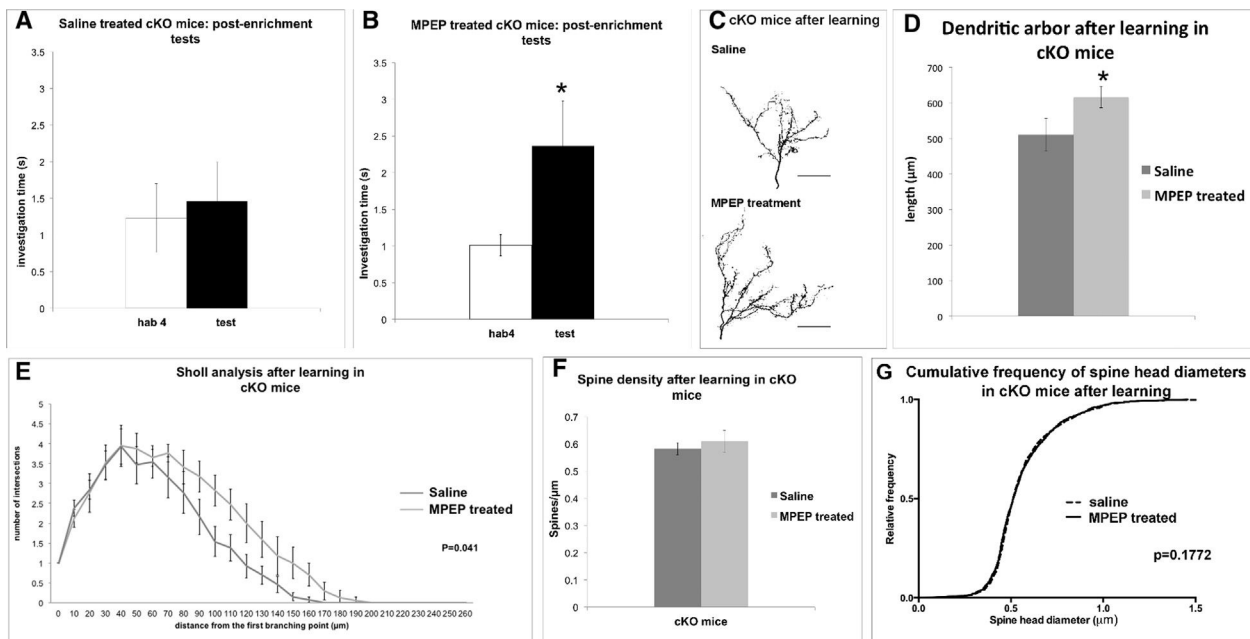
This suggests that the rescue of dendritic arbor plasticity defects induced by MPEP treatment is sufficient to rescue the learning phenotype.

#### **$\alpha$ CaMKII mRNA Dendritic Local Translation Is Necessary for Olfactory Perceptual Learning and Associated Structural Plasticity**

$\alpha$ CaMKII mRNA is one of FMRP's mRNA targets (5) and a major actor in synaptic plasticity.  $\alpha$ CaMKII mRNA is dendritically localized and locally translated in different regions of the brain, including the OB (12). We thus asked if  $\alpha$ CaMKII local translation is necessary for olfactory perceptual learning and associated structural plasticity. We used mice in which  $\alpha$ CaMKII 3'UTR is replaced by the 3'UTR of an unlocalized mRNA (25) (hereafter called  $\Delta$ 3'UTR). We previously showed that in these mice, OB dendritic localization and local translation of  $\alpha$ CaMKII mRNA are severely disrupted and that

olfactory associative learning is impaired (12).  $\Delta$ 3'UTR mice were thus subjected to the nonassociative olfactory perceptual learning used here. Contrary to WT littermates (Figure 5A) and similar to *Fmr1* mutated mice,  $\Delta$ 3'UTR mice did not learn to discriminate Lim+ from Lim- (Figure 5B; Figure S3A,B in Supplement 1). This failure in perceptual learning is not due to a general olfactory defect (12) and cannot be ascribed to a decreased neuronal production in the OB (density of BrdU-labeled cells in the GC layer after learning; WT:  $96 \pm 7$  cells/mm<sup>2</sup>;  $\Delta$ 3'UTR:  $89 \pm 7$  cells/mm<sup>2</sup>;  $n = 4$  mice per group, Mann-Whitney rank sum tests,  $p = .343$ ).

Similar to cKO mice, under basal conditions, new neurons in  $\Delta$ 3'UTR mice display normal dendritic arbor length (Figure 5C–E) and increased spine density compared with WT mice ( $p = .02$ ) (Figure 5G,H). Strikingly, after learning, new neurons in  $\Delta$ 3'UTR mice display structural plasticity defects comparable with cKO mice, with a lack of dendritic lengthening and a lack of increase in dendritic complexity



**Figure 4.** (A) Postenrichment discrimination test for limonene+ and limonene- in conditional knockout (cKO) mice injected with saline during the enrichment period of the perceptual learning. They cannot discriminate limonene+ from limonene- (paired Student *t* test,  $p = .619$ ,  $n = 11$ ). (B) Postenrichment discrimination test for limonene+ and limonene- in cKO mice injected with 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) during the enrichment period of the perceptual learning. They spend significantly more time investigating the test odor than the habituation odor, indicating perceptual learning (significant difference between investigation times for hab4 and test (paired Student *t* test,  $p = .001$ ,  $n = 10$ ).  $*p < .05$ ). (C) Representative binarized pictures of the dendritic arbors of green fluorescent protein labeled new granule cells (GCs) after learning in saline or MPEP-injected cKO mice. Scale bar: 40 μm. (D) Dendritic arbor length of new GCs in cKO mice in learning conditions after injections with saline or MPEP. FMRP-depleted neurons from MPEP-treated cKO mice display longer dendritic arbor than FMRP-depleted neurons from saline-treated cKO mice (unpaired Student *t* test,  $p = .037$ ,  $n = 13$ , 14).  $*p < .05$ . (E) Sholl analysis of the dendritic complexity of new GCs in cKO mice injected with MPEP or saline. New GCs display increased complexity in MPEP-injected cKO mice, as compared with saline-injected cKO mice (repeated-measures analysis of variance with two factors:  $F_{1,23} = 4.692$ ,  $p = .041$ ,  $n = 14$ , 12). (F) Spine density in the dendritic arbors of new GCs in cKO mice injected with saline or MPEP during the learning period: the MPEP treatment does not induce any change (unpaired Student *t* test,  $p = .37$ ,  $n = 14$ , 10). (G) Cumulative frequency distribution of spine head diameters of new neurons from cKO mice injected with saline or MPEP during the learning period: the MPEP treatment does not induce any change (Kolmogorov-Smirnov test,  $p = .1772$ ). hab4, investigation time of the habituation odor during the fourth trial of habituation; test, investigation time of test odor (the other odorant of the pair).

(Figure 5C–F). Moreover, learning had no effect on  $\Delta 3'$ UTR mice spine density (Figure 5G',G'',H) and did not increase spine head diameters (Figure 5J), in contrast to their WT littermates (Figure 5G,G'',I).

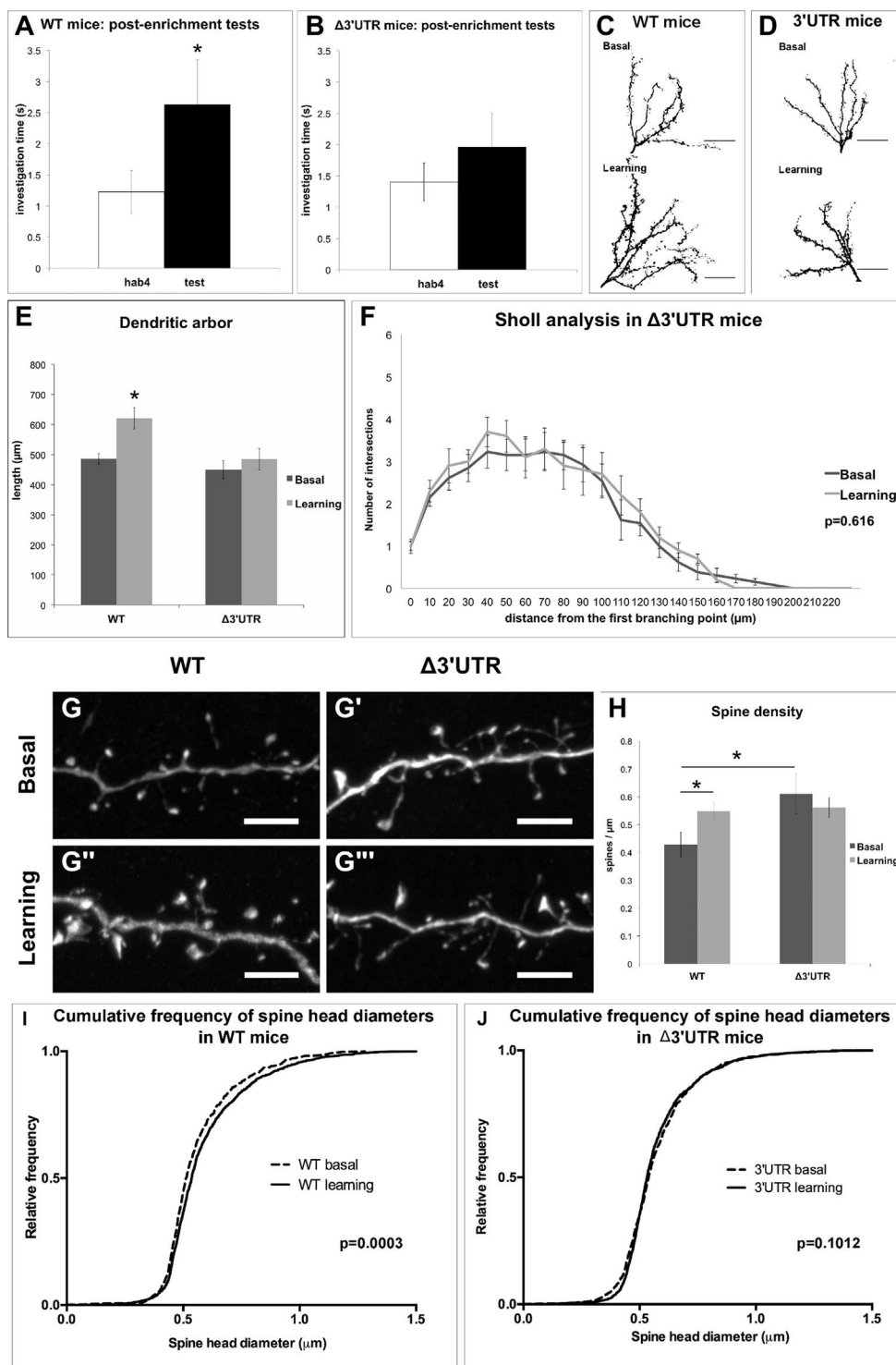
Collectively, these data suggest that  $\alpha$ CaMKII local translation is necessary for olfactory perceptual learning and associated structural plasticity. It also suggests that  $\alpha$ CaMKII mRNA may be the main FMRP mRNA target involved in olfactory learning-induced structural plasticity of new neurons.

### Olfactory Perceptual Learning Induces an FMRP-Dependent Increase of $\alpha$ CaMKII Dendritic Local Translation in Adult-Born Neurons

To directly substantiate a link between  $\alpha$ CaMKII local translation and FMRP, we used a previously validated reporter of  $\alpha$ CaMKII local translation (26) in WT and *Fmr1* mutated mice. In this reporter, the 3'UTR extremity of  $\alpha$ CaMKII mRNA, which mediates its dendritic localization and translational regulation (27) and can be bound by FMRP (28), is associated with a GFP mRNA so that transport and translation of the GFP mRNA reflect the endogenous  $\alpha$ CaMKII. The GFP is in an unstable and rapidly degraded membrane-bound form (a destabilized

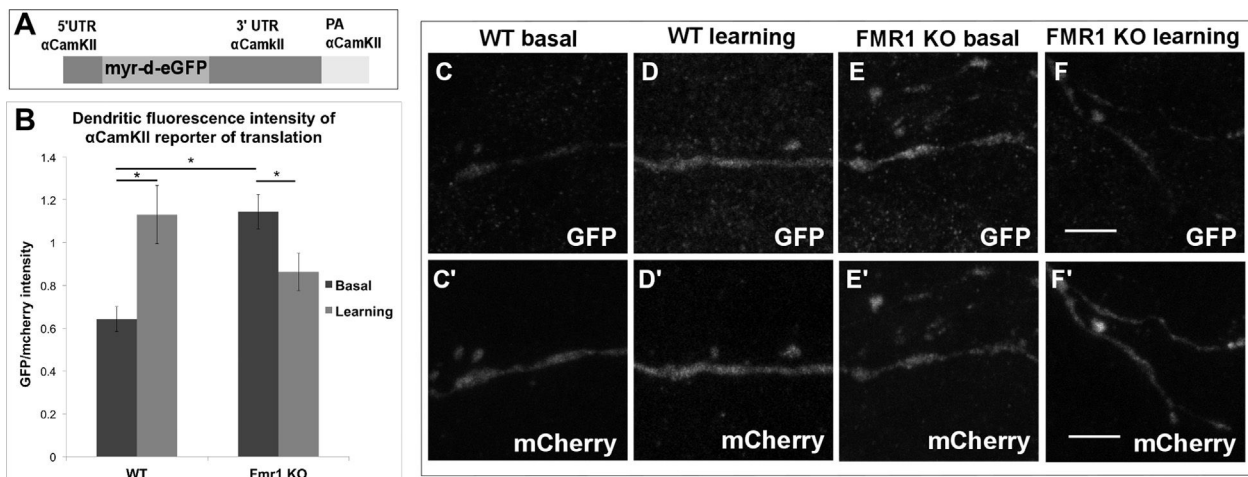
and myristoylated GFP; Figure 6A). Consequently, the presence of GFP is indicative of recent locally translated protein. To label new neurons and to analyze  $\alpha$ CaMKII dendritic local translation, we produced an adenovirus (AdV; serotype5) expressing this reporter. Given the relatively low rate of recombination in cKO mice and the low number of cells infected by the AdV, we injected it in the subventricular zone of WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice. To normalize the staining, we co-injected an mCherry-expressing AdV, whose staining intensity did not vary in the different conditions (Figure S4 in Supplement 1). We measured the intensity of GFP dendritic labeling over mCherry intensity in new double-infected GCs in basal and learning conditions. Learning induced a significant increase of the translation reporter's dendritic labeling in WT mice (Figure 5B–D). In KO mice, this dendritic labeling is increased in basal conditions as compared with WT mice (Figure 6B,C,E). This increased dendritic labeling of the reporter in WT mice is in line with  $\alpha$ CaMKII mRNA being a translational target of FMRP, normally acting as a brake on its translation (5). However, in KO mice, the dendritic labeling in new GCs was not increased after learning (Figure 6B,E,F) and, surprisingly, was even decreased. This might be the result of a





**Figure 5.** (A, B) Postenrichment discrimination test for limonene+ and limonene- in wild-type (WT) mice (A) or mice ablated for alpha subunit of the calcium/calmodulin-dependent kinase II 3' untranslated region (Δ3'UTR) (B). WT mice can discriminate the two odorants (significant difference between hab4 and test,  $p = .036$  with a Wilcoxon paired test,  $n = 8$ ), whereas Δ3'UTR mice cannot ( $p = .203$  with a Wilcoxon paired test,  $n = 10$ ). (C, D) Representative binarized pictures of the dendritic arbors of green fluorescent protein-labeled new granule cells (GCs) in WT mice (C) and Δ3'UTR mice (D). Scale bar: 40 μm. (E) Dendritic arbor length of new GCs in WT and Δ3'UTR mice in basal or learning conditions. Perceptual learning induces a lengthening of neurons in WT mice ( $p = .018$ ) but not in Δ3'UTR mice ( $p = .99$ ). (Two-way analysis of variance [ANOVA]: genotype effect,  $F_{1,55} = 7.748$ ,  $p = .007$ ; learning effect,  $F_{1,55} = 7.53$ ,  $p = .008$ ; genotype-learning interaction,  $F_{1,55} = 2.579$ ,  $p = .114$ , followed by least significant difference post hoc test,  $n = 14, 16, 16, 13$ ). (F) Sholl analysis of the dendritic complexity of new GCs in Δ3'UTR mice. New GCs display similar complexity in basal or learning conditions (repeated-measures ANOVA:  $F_{1,21} = .258$ ,  $p = .616$ ,  $n = 13, 10$ ). (G-G''') Representative pictures showing spines of the dendritic arbor of green fluorescent protein-labeled new GCs from WT and Δ3'UTR mice in basal or learning conditions. Scale bars: 5 μm. (H) Spine density in the dendritic arbors of new GCs in WT or Δ3'UTR mice in basal or learning conditions. Perceptual learning induces an increase of spine density in WT mice ( $p = .008$ ) but not in Δ3'UTR mice ( $p = .865$ ). (Two-way ANOVA: genotype effect,  $F_{1,63} = 8.13$ ,  $p = .006$ ; learning effect,  $F_{1,55} = .955$ ,  $p = .332$ ; genotype-learning interaction,  $F_{1,63} = 3.961$ ,  $p = .05$ , followed by least significant difference post hoc test,  $n = 14, 21, 17, 17$ ). (I, J) Cumulative frequency distribution of spine head diameters of new neurons from WT (I) and Δ3'UTR (J) mice with or without learning. Learning induces a significant shift toward larger diameters in WT mice (Kolmogorov-Smirnov test,  $p < .001$ ) but not in Δ3'UTR mice (Kolmogorov-Smirnov test,  $p > .05$ ).

Smirnov test,  $p > .05$ ). hab4, investigation time of the habituation odor during the fourth trial of habituation; test, investigation time of test odor (the other odorant of the pair). \* $p < .05$ .



**Figure 6.** (A) Scheme of the alpha subunit of the calcium/calmodulin-dependent kinase II ( $\alpha$ CaMKII) reporter of translation. (B) Ratio of the dendritic labeling of new granule cells (GCs) by the green fluorescent protein (GFP) translation reporter over an mCherry normalizer in wild-type (WT) and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice in basal or learning conditions. (Two-way analysis of variance: genotype effect,  $F_{1,68} = 9.39$ ,  $p = .247$ ; learning effect,  $F_{1,68} = 1.36$ ,  $p = .257$ ; genotype-learning interaction,  $F_{1,68} = 1.30$ ,  $p < .0001$ , followed by least significant difference post hoc test,  $n = 28, 44, 38, 34$ ). Learning induces an increase in the dendritic labeling of new GCs in WT mice ( $p < .01$ ). In basal conditions, new GCs from *Fmr1* knockout (KO) mice display increased dendritic labeling as compared with WT mice ( $p = .012$ ). Learning does not increase this labeling and even reduces it ( $p = .031$ ).  $*p < .05$ . (C–F') Representative pictures of the dendritic labeling of new GCs doubly infected with the Myr-d-eGFP reporter of translation (C–F) and an mCherry normalizer (C'–F') in WT and *Fmr1* KO mice in basal or learning conditions. Scale bars: 5  $\mu$ m. Myr-d-eGFP, myristoylated destabilized enhanced green fluorescent protein; PA, polyadenylation sequence; UTR, untranslated region.

destabilization of the reporter's mRNA and/or its decreased translation as a compensatory mechanism consequent to FMRP's absence.

Collectively, our data suggest that olfactory perceptual learning induces an FMRP-dependent increase of  $\alpha$ CaMKII local translation in new neurons and that  $\alpha$ CaMKII mRNA could be the main FMRP mRNA target involved in the structural plasticity necessary for olfactory learning.

## DISCUSSION

Here, we report that new neurons of the adult OB are structurally plastic in response to olfactory learning and that this plasticity is FMRP and  $\alpha$ CaMKII local translation dependent. We thus uncover a new and essential role for dendritic local translation in the structural modifications underlying learning.

Structural plasticity is a determinant of learning, allowing spatial modifications of circuits through gain and loss of synapses (1). We show here that perceptual nonassociative learning induces an increase of spine density in the apical dendritic arbor of new OB neurons. These spines are synaptically connected to mitral/tufted cells, the OB principal projection neurons. In recent work using associative olfactory learning, an increase in spine density in new OB neurons was observed (29) not in the apical dendritic arbor but in the deep dendritic domain of new GCs, whose spines receive top-down inputs. This raises the interesting possibility that different types of learning might induce different types of structural plasticity in new OB neurons, linking their optimal connectivity to environmental demands. Perceptual learning also induces a lengthening of dendritic arbors accompanied by an increased complexity of new neurons, thus profoundly modifying their

morphology, similar to adult-born hippocampal neurons during spatial learning (30). In most regions of the adult brain, the retraction or growth of dendritic branches are limited and rare once critical periods of development have ended (31). Adult-born OB neurons are thus endowed with unique structural properties, as also suggested by two-photon live imaging studies (32) and monosynaptic tracing (33). As a consequence, remodeling of their geometry upon integration might allow for profound modifications of their connectivity.

We show that FMRP is necessary for olfactory perceptual learning and associated structural modifications. The cKO mouse we used was previously shown to display reduced neurogenesis in the adult hippocampus and spatial learning defects (23). This learning deficit may also be the consequence of a lack of structural plasticity of new hippocampal neurons due to the loss of FMRP, similar to what we observe in the OB. A role for FMRP in activity-dependent dendritic remodeling is consistent with defective critical periods observed in *Fmr1* KO mice (6,7) and studies of drosophila FMRP null flies reporting activity-dependent pruning deficits (15). Remarkably, we show that antagonizing mGluR signaling in mutated mice through MPEP injections is sufficient to rescue learning and dendritic remodeling. This MPEP effect on dendritic arbor is in line with the genetic rescue of critical period plasticity defects observed in the visual cortex of *Fmr1* KO mice with reduced metabotropic glutamate receptor 5 expression (7). MPEP had no effect on spine density or morphology defects, which suggests that the rescue of dendritic arbor plasticity defects induced by MPEP treatment is sufficient to rescue the learning phenotype. However, one of the consequence of the dendritic arbor lengthening induced by MPEP is also a corresponding increase in the number of spines, which might participate in the learning rescue.

FMRP has numerous mRNA targets including  $\alpha$ CaMKII (5). In addition to regulating synaptic strength,  $\alpha$ CaMKII is an important regulator of structural plasticity (34–36). However, its role in structural plasticity has never been correlated with its dendritic local translation. We thus used a reporter of translation to monitor the *in vivo* dendritic translation of  $\alpha$ CaMKII in new neurons upon learning. This type of reporter is commonly used in cultured cells (26,37) and was used in *Drosophila* to report increased local synthesis of  $\alpha$ CaMKII following olfactory training (38). Even if our analysis of the reporter in fixed tissue did not allow time-lapse analysis of the staining to clearly ascertain that increased fluorescence of the reporter reflects its increased local translation, our data suggest that olfactory perceptual learning increases  $\alpha$ CaMKII dendritic synthesis in new neurons. This is consistent with our morphological data showing that learning induces an increased number of spines in new neurons: these supernumerary spines might trigger an elevated glutamatergic input onto these cells, which could lead to increased glutamate-induced dendritic translation of the reporter, as previously observed in cultured hippocampal neurons (39). Interestingly, dendritic synthesis of the reporter was elevated in new neurons of *Fmr1* KO mice in basal conditions, which is in line with  $\alpha$ CaMKII being a translational target of FMRP, repressing its translation in basal conditions (5) through binding to its 3'UTR (28). Remarkably, this elevated synthesis could not be further increased by learning and was even decreased. As FMRP has been described as an mRNA stabilizer (40), its absence could lead to an instability of the reporter, leading to a reduced translation, particularly visible in learning conditions. Alternatively, this reduction could be the consequence of a compensatory mechanism in *Fmr1* KO mice unveiled in learning conditions through, for example, recruitment of another RNA-binding protein regulating local translation.

To investigate the function of  $\alpha$ CaMKII local translation in new OB cells, we used mice in which  $\alpha$ CaMKII 3'UTR was ablated. These mice were previously shown to display deficits in forms of hippocampal and olfactory memory (12,27). We show here that these mice are also defective for olfactory perceptual learning, which is accompanied by a lack of new OB neuron structural plasticity. As these mice are constitutively mutated in all  $\alpha$ CaMKII expressing cells, it is difficult to circumscribe the cell-autonomous effects of the mutation. However, our reporter of translation data strongly suggest that  $\alpha$ CaMKII is locally translated in new GCs upon learning, which lends support to the fact that defects in  $\alpha$ CaMKII local translation might be directly related to the defective structural plasticity of new GCs. The similarity between the  $\Delta$ 3'UTR mice and the *Fmr1* mutated mice is striking: they display the same learning deficits accompanied by similar structural plasticity defects, which points to  $\alpha$ CaMKII as the main FMRP target responsible for these phenotypes. However, paradoxically, the  $\Delta$ 3'UTR mice display reduced  $\alpha$ CaMKII local translation (12), whereas *Fmr1* mutated mice display increased  $\alpha$ CaMKII local translation, as seen with our reporter of translation. This suggests that what is important for learning and associated structural modifications is not the absolute quantity of locally translated  $\alpha$ CaMKII but rather the possibility of a learning-induced increase in  $\alpha$ CaMKII local translation. This FMRP-regulated increase might be essential for a function of locally

translated  $\alpha$ CaMKII in spinogenesis and dendritogenesis, necessary for learning.

Our work reveals a central role for an FMRP-regulated dendritic translation of  $\alpha$ CaMKII in the structural plasticity underlying olfactory learning. This is important in a context where impairment of activity-dependent circuit assembly (15,17) and defects in critical period plasticity (16) are considered at the center of ASD, among which FXS is the primary monogenic cause.

## ACKNOWLEDGMENTS AND DISCLOSURES

This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Pierre et Marie Curie, and Fondation Lejeune Grants. SG benefited from a postdoctoral fellowship from Region Ile de France. The Development and Plasticity of Neural Networks team is affiliated with the Paris School of Neuroscience, which provided help for the viral production and with the Bio-Psy Laboratory of Excellence.

We thank the Institut Biologie Paris Seine for imaging and animal facilities. We thank Dr. B. Oostra for providing *Fmr1* knockout and conditional knockout mice, Dr. A. Eisch for Nestin::CreERT2 mice, and Dr. M. Mayford for alpha subunit of the calcium/calmodulin-dependent kinase II 3'-untranslated region mice. CamKII 3'UTR mice A plasmid encoding the alpha subunit of the calcium/calmodulin-dependent kinase II translation reporter was generously provided to us by Dr. E. Schuman. We are also very grateful to Dr. I. Dusart for helpful discussions about the work and manuscript.

All authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

## ARTICLE INFORMATION

From the Sorbonne Universités (LD, SG, MD, SS-L, CD, AT, IC), Université Pierre et Marie Curie Univ Paris 06, Centre National de la Recherche Scientifique UMR8246, INSERM U1130, IBPS, Neuroscience Paris Seine, France; Sorbonne Paris Cité (IC), Université Paris Diderot- Paris 7; Université Lyon1 (AD, NM), CNRS UMR 5292, INSERM U1028, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon; and Yale University School of Medicine (CAG), Department of Neurosurgery, New Haven, Connecticut.

Address correspondence to Isabelle Caillé, Ph.D., UPMC, Development and Plasticity of Neural Networks, 9 quai St Bernard, UMR CNRS 8246, Paris 75005, France; E-mail: isabelle.caille@snv.jussieu.fr.

Received Feb 18, 2015; revised Jul 16, 2015; accepted Jul 22, 2015.

Supplementary material cited in this article is available online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.023>.

## REFERENCES

1. Caroni P, Donato F, Muller D (2012): Structural plasticity upon learning: Regulation and functions. *Nat Rev Neurosci* 13:478–490.
2. Sutton MA, Schuman EM (2006): Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* 127:49–58.
3. Chelly J, Mandel JL (2001): Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* 2:669–680.
4. Bhakar AL, Dolen G, Bear MF (2012): The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). *Annu Rev Neurosci* 35:417–443.
5. Bassell GJ, Warren ST (2008): Fragile X syndrome: Loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* 60:201–214.
6. Harlow EG, Till SM, Russell TA, Wijetunge LS, Kind P, Contractor A (2010): Critical period plasticity is disrupted in the barrel cortex of *FMR1* knockout mice. *Neuron* 65:385–398.
7. Dolen G, Osterweil E, Rao BS, Smith GB, Auerbach BD, Chattarji S, Bear MF (2007): Correction of fragile X syndrome in mice. *Neuron* 56:955–962.

8. Pan F, Aldridge GM, Greenough WT, Gan WB (2010): Dendritic spine instability and insensitivity to modulation by sensory experience in a mouse model of fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 17768–17773.
9. Cruz-Martin A, Crespo M, Portera-Cailliau C (2010): Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice. *J Neurosci* 30:7793–7803.
10. Padmashri R, Reiner BC, Suresh A, Spartz E, Dunaevsky A (2013): Altered structural and functional synaptic plasticity with motor skill learning in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci* 33: 19715–19723.
11. Scotto-Lomassese S, Nissant A, Mota T, Neant-Fery M, Oostra BA, Greer CA, *et al.* (2011): Fragile X mental retardation protein regulates new neuron differentiation in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 31: 2205–2215.
12. Neant-Fery M, Peres E, Nasrallah C, Kessner M, Gribaudo S, Greer C, *et al.* (2012): A role for dendritic translation of CaMKIIalpha mRNA in olfactory plasticity. *PLoS One* 7:e40133.
13. Gross C, Berry-Kravis EM, Bassell GJ (2012): Therapeutic strategies in fragile X syndrome: Dysregulated mGluR signaling and beyond. *Neuropsychopharmacology* 37:178–195.
14. Jacquemont S, Berry-Kravis E, Hagerman R, von Raison F, Gasparini F, Apostol G, *et al.* (2014): The challenges of clinical trials in fragile X syndrome. *Psychopharmacology (Berl)* 231:1237–1250.
15. Doll CA, Broadie K (2014): Impaired activity-dependent neural circuit assembly and refinement in autism spectrum disorder genetic models. *Front Cell Neurosci* 8:30.
16. LeBlanc JJ, Fagioli M (2011): Autism: A “critical period” disorder? *Neural Plast* 2011:921680.
17. Doll CA, Broadie K (2015): Activity-dependent FMRP requirements in development of the neural circuitry of learning and memory. *Development* 142:1346–1356.
18. Mandaïron N, Stack C, Kiselycznyk C, Linster C (2006): Broad activation of the olfactory bulb produces long-lasting changes in odor perception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13543–13548.
19. Moreno MM, Linster C, Escanilla O, Sacquet J, Didier A, Mandaïron N (2009): Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17980–17985.
20. Mientjes EJ, Nieuwenhuizen I, Kirkpatrick L, Zu T, Hoogeveen-Westerveld M, Severijnen L, *et al.* (2006): The generation of a conditional Fmr1 knock out mouse model to study Fmrp function in vivo. *Neurobiol Dis* 21:549–555.
21. Schilit Nitenson A, Stackpole EE, Truskowski TL, Midroit M, Fallon JR, Bath KG (2015): Fragile X mental retardation protein regulates olfactory sensitivity but not odorant discrimination. *Chem Senses* 40:345–350.
22. Lagace DC, Whitman MC, Noonan MA, Ables JL, DeCarolis NA, Arguello AA, *et al.* (2007): Dynamic contribution of nestin-expressing stem cells to adult neurogenesis. *J Neurosci* 27:12623–12629.
23. Guo W, Allan AM, Zong R, Zhang L, Johnson EB, Schaller EG, *et al.* (2011): Ablation of Fmrp in adult neural stem cells disrupts hippocampus-dependent learning. *Nat Med* 17:559–565.
24. Bear MF, Huber KM, Warren ST (2004): The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci* 27:370–377.
25. Miller S, Yasuda M, Coats JK, Jones Y, Martone ME, Mayford M (2002): Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* 36:507–519.
26. Aakalu G, Smith WB, Nguyen N, Jiang C, Schuman EM (2001): Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* 30:489–502.
27. Mayford M, Baranes D, Podsypanina K, Kandel ER (1996): The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13250–13255.
28. Subramanian M, Rage F, Tabet R, Flatter E, Mandel JL, Moine H (2011): G-quadruplex RNA structure as a signal for neurite mRNA targeting. *EMBO Rep* 12:697–704.
29. Lepousez G, Nissant A, Bryant AK, Gheusi G, Greer CA, Lledo PM (2014): Olfactory learning promotes input-specific synaptic plasticity in adult-born neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:13984–13989.
30. Tronel S, Fabre A, Charrier V, Oliet SH, Gage FH, Abrous DN (2010): Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7963–7968.
31. Holtmaat A, Svoboda K (2009): Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci* 10:647–658.
32. Mizrahi A (2007): Dendritic development and plasticity of adult-born neurons in the mouse olfactory bulb. *Nat Neurosci* 10: 444–452.
33. Arenkiel BR, Hasegawa H, Yi JJ, Larsen RS, Wallace ML, Philpot BD, *et al.* (2011): Activity-induced remodeling of olfactory bulb microcircuits revealed by monosynaptic tracing. *PLoS One* 6:e29423.
34. Okamoto K, Narayanan R, Lee SH, Murata K, Hayashi Y (2007): The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6418–6423.
35. Jourdain P, Fukunaga K, Muller D (2003): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to activity-dependent filopodia growth and spine formation. *J Neurosci* 23:10645–10649.
36. Wu GY, Cline HT (1998): Stabilization of dendritic arbor structure in vivo by CaMKII. *Science* 279:222–226.
37. Banerjee S, Neveu P, Kosik KS (2009): A coordinated local translational control point at the synapse involving relief from silencing and MOV10 degradation. *Neuron* 64:871–884.
38. Ashraf SI, McLoon AL, Sclarsic SM, Kunes S (2006): Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell* 124:191–205.
39. Gong R, Park CS, Abbassi NR, Tang SJ (2006): Roles of glutamate receptors and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in activity-dependent dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 281:18802–18815.
40. Bagni C, Oostra BA (2013): Fragile X syndrome: From protein function to therapy. *Am J Med Genet A* 161A:2809–2821.





## **FMRP and Dendritic Local Translation of $\alpha$ CaMKII Messenger RNA Are Required for the Structural Plasticity Underlying Olfactory Learning**

### ***Supplemental Information***

#### **Supplemental Methods and Materials**

##### **Stereotaxic Injections**

Fifteen days after the last tamoxifen injection (Fig.2A), 5 mice per group were stereotaxically injected in the subventricular zone (SVZ) with a GFP-expressing lentivirus as described (1). In our conditions, the injections yielded 50-100 GFP-labeled neurons per 60  $\mu$ m-thick OB section, a density compatible with morphological analysis of entire neurons.

For local translation analysis, an adenovirus expressing  $\alpha$ CaMKII translation reporter (2) (Ad CMV-eGFPmyr- $\alpha$ CaMKII 3'UTR, serotype 5) was co-injected with a serotype 5 adenovirus expressing the mCherry under the CMV promoter (Vector Biolabs, ref 1767) to normalize the intensity of staining.

##### **Histology**

Sacrifice of mice was carried out after the period of perceptual learning followed by the discrimination test, corresponding to 28 days post injection of the virus in the subventricular zone.

Anesthetized mice were fixed as described previously (1). Sixty  $\mu$ m frontal sections of olfactory bulb were saturated in blocking solution (10% fetal bovine serum; 0.5% Triton-X in PBS) for one hour at room temperature. The sections were then incubated in the blocking solution for 48 to 72 hours at 4°C with the primary antibodies: mouse anti-FMRP 2F5 (1:200, from Developmental Studies Hybridoma Bank), chicken anti-GFP (1:1000, from AVES #GFP1020), mouse anti-BrdU (1:1000, from BD biosciences #347580). The mouse anti-FMRP 2F5 required antigen retrieval consisting in incubating the sections at 95°C during 15 min in a 10 mM sodium citrate solution prior to saturation. The mouse anti-BrdU required incubation in 2N HCl for 30 minutes at 37°C prior to saturation. The secondary antibodies used were Cy3-conjugated donkey anti-mouse (1:2000, Jackson ImmunoResearch #715-165-151) and Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-chicken (1:1000, Jackson ImmunoResearch #703-546-155). Sections were counter-colored with DAPI and mounted in Mowiol.

##### **Image Analysis**

All images were acquired on a Leica SP5 confocal microscope. Z-series stacks of confocal images were acquired using 1024 X 1024 pixel resolution.

*Morphological Analysis.* Since enrichment with limonene<sup>+</sup> and limonene<sup>-</sup> induces a broad granular

cell activation in the olfactory bulb (3), GFP-labeled neurons were chosen independently of their position in the granule cell layer. Thirteen to 17 neurons from 3 to 5 mice were analyzed for each condition. Only neurons displaying characteristics of fully differentiated granule cells and contained entirely in the sections were considered. In *Fmr1* cKO mice, the analysis was conducted only in FMRP immunonegative granule cells. For the analysis of dendrites, images were acquired using a X20 objective, zoom 1.5, z-step 1  $\mu\text{m}$ . For the analysis of spines, images were acquired using X63 objective, zoom 3, z-step 0.13  $\mu\text{m}$ . The images were deconvoluted using Huygens software and morphological analysis of GFP labeled neurons was performed with NeuronStudio software as described (1). Spines were manually identified and their length and head diameters measured automatically by NeuronStudio. To measure dendritic complexity, we built sholl index (4) using the simple neurite tracer image J plugin. A series of concentric circles with 10  $\mu\text{m}$  intervals was placed over the neurons and centered on the first branching point of the primary dendrite. The number of dendrites crossing the circles was expressed as a function of distance from the first branching point.

*Fluorescence Quantification of the Translation Reporter.* Fluorescence from 14 to 25 dendrites colabeled with the  $\alpha\text{CaMKII}$  local translation reporter and the mCherry normalizer from 3 mice per condition was analyzed. Images were acquired using X63 objective zoom 4. The fluorescence intensity in the dendrites of adult born neurons expressing the  $\alpha\text{CaMKII}$  translation reporter was measured using Image J software. The mean GFP fluorescence intensity was measured in a manually outlined area and normalized over the mean mCherry intensity in the same area.

*BrdU Quantification.* Neuronal production in the olfactory bulb of control cKO/cKO mice and WT/3'UTR mice was assessed by injecting intraperitoneally 4 mice with BrdU (40 mg/kg) 15 days before starting perceptual learning.

One out of four frontal 50  $\mu\text{m}$  thick sections were analyzed thus representing the entire rostro-caudal extent of the OB (around 20 sections per animal). Images of the granule cell layer were acquired with X20 objective. The analysis was carried out using 3D object counter Image J plugin. This plugin allowed us to determine a fluorescence threshold for binarization of the images, followed by automated counting of BrdU spots. The surface of the granule cell layer was manually outlined for measurement and the density of BrdU positive cells was calculated.

### **Tamoxifen Administration**

Nestin::CreERT2XFmr1<sup>flox/flox</sup> (cKO mice) male mice were injected intraperitoneally with tamoxifen (Sigma) 80 mg/kg/day for ten days. Control mice were littermates that did not inherit the Nestin::CreERT2 allele, also injected with tamoxifen (control cKO).

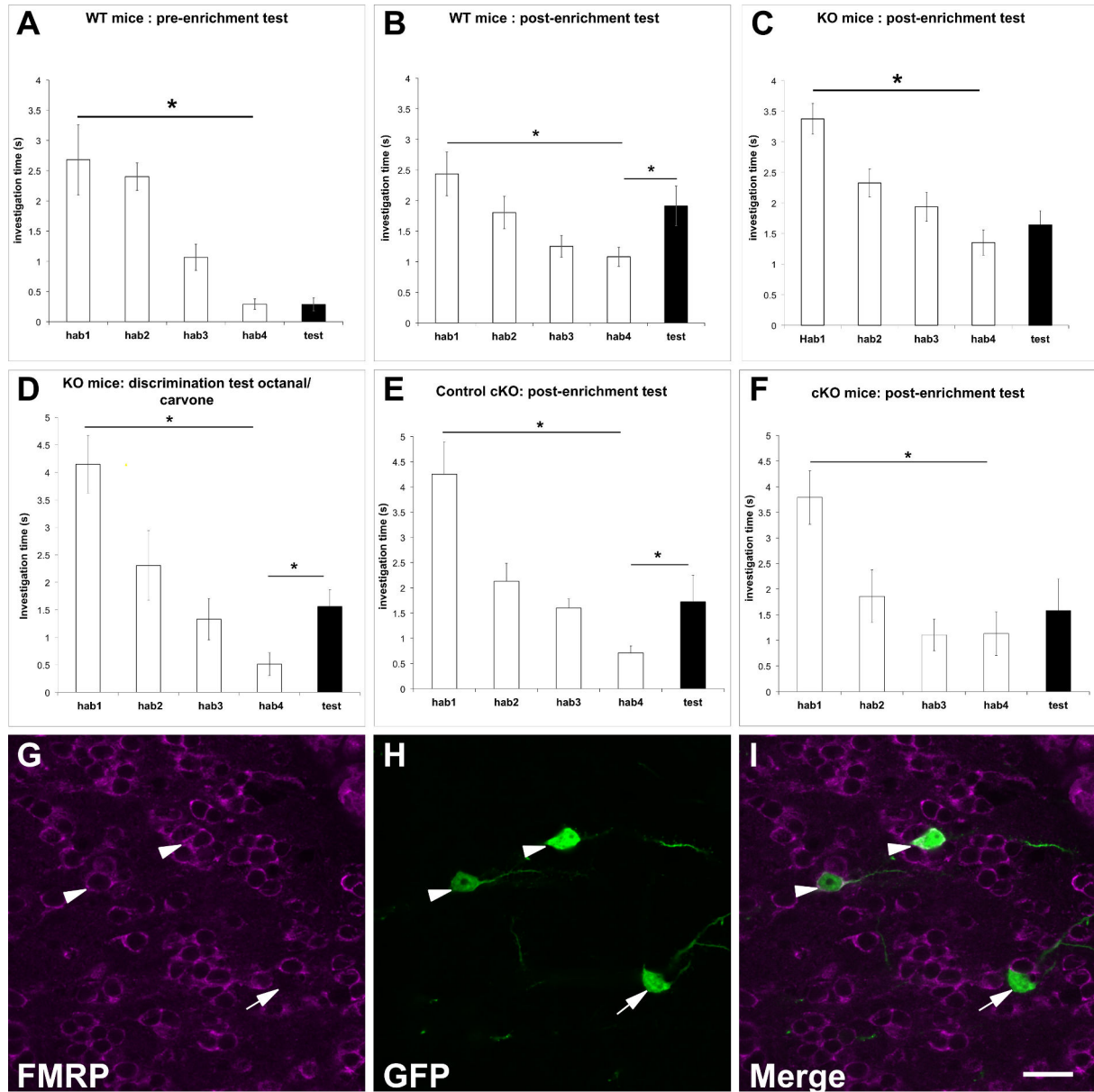
### **MPEP Administration**

Control cKO and cKO mice were injected intraperitoneally with MPEP (20 mg/kg/day) (Tocris) or the 200  $\mu$ L of saline as a control vehicle during the period of olfactory enrichment, 5 hours before exposure to the odorants.

### **Statistical Analysis**

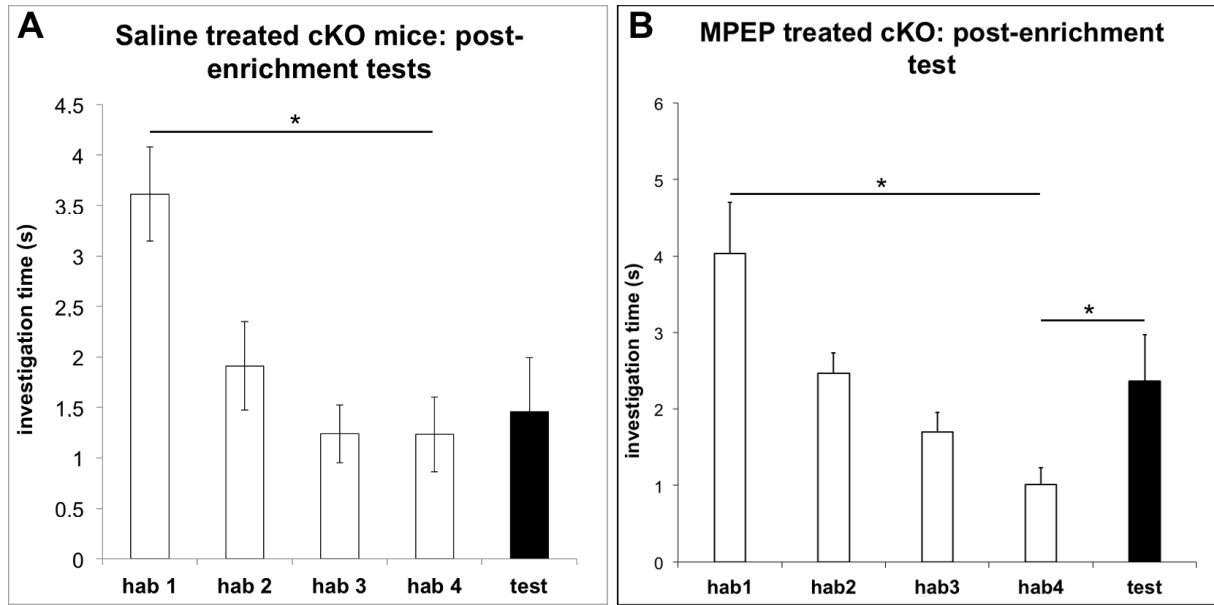
Data were analyzed with SPSS statistical software version 22.0 (Chicago, Illinois, USA). Normality in variable distributions and homogeneity of variances across groups were assessed with the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Variables that failed any of these tests were analyzed with nonparametric statistics using the Kruskal–Wallis analysis of variance on ranks followed by Mann–Whitney rank sum with Dunn-Sidak adjustment tests for pair-wise multiple comparisons. Variables that passed the normality test were analyzed with ANOVA followed by LSD post hoc test for multiple comparisons or by Student's *t* test for comparing two groups

Paired data were analyzed using repeated-measures ANOVA with two factors followed by Bonferroni post hoc test for multiple comparisons. Student's *t* test or paired Wilcoxon test were used for comparing two groups. The cumulative frequency distributions of spine head diameter were compared using Kolmogorov-Smirnov test. A *p* value of  $< 0.05$  was used as a cut-off for statistical significance. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. The statistical tests are described in each figure legend. Asterisks indicate statistical significance.

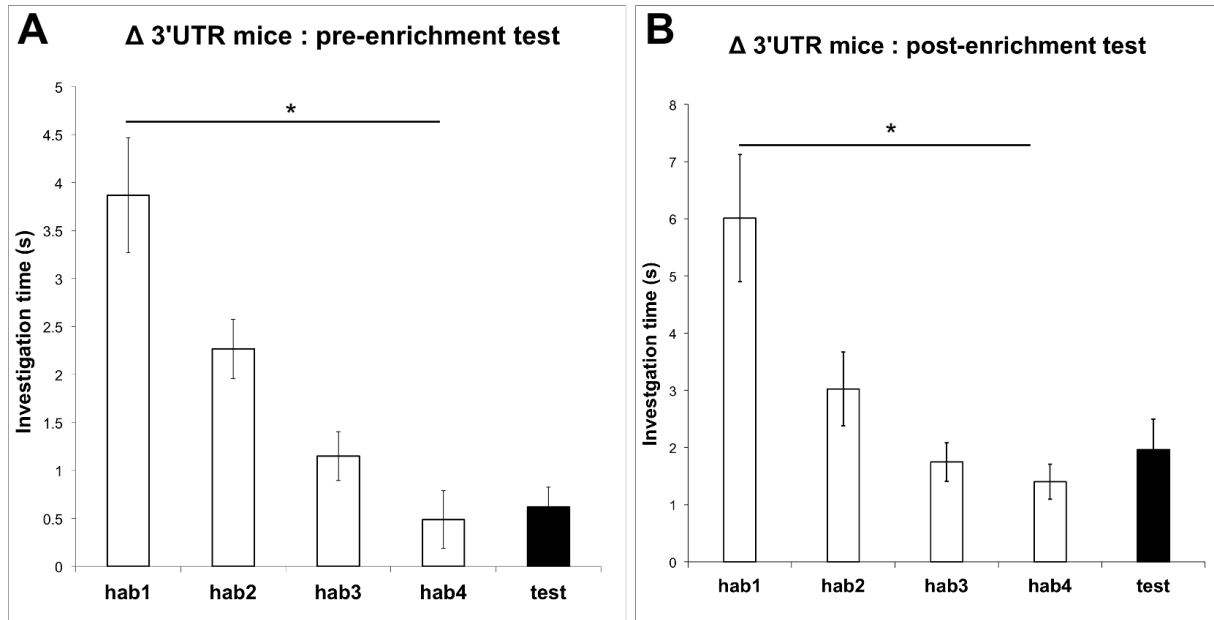


**Figure S1.** (A) Habituation/dishabituation test for Lim<sup>+</sup> and Lim<sup>-</sup> of WT mice before the enrichment period. They show significant habituation (decrease of investigation time of the habituation odor across habituation trials Hab1-4, (repeated-measures one way ANOVA  $F_{(1,9)} = 56.415$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 10$ ) but display no significant difference in the investigation time between the 4<sup>th</sup> habituation trial (Hab4) and the test odor, the other odorant of the pair (Test) (see Fig. 1B). This reflects a lack of spontaneous discrimination between the two odorants in naïve WT mice. (B,E) Habituation/dishabituation test for Lim<sup>+</sup> and Lim<sup>-</sup> of WT (B) or control cKO (E) mice after the enrichment period. They show significant habituation ((B) repeated-measures one way ANOVA  $F_{(1,9)} = 89.194$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 10$ ; (E) repeated-measures one way ANOVA  $F_{(1,8)} = 93.596$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 9$ ) and a significant difference in the investigation time between the 4<sup>th</sup> habituation trial (Hab4) and the test odor (Test) (see Fig. 1C, 1E). This reflects perceptual learning. (C,F) Habituation/dishabituation test for Lim<sup>+</sup>/<sup>-</sup> of KO (C) or cKO (F) mice after the enrichment period. They show significant habituation ((C) repeated-measures one way ANOVA  $F_{(1,9)} = 145.17$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 9$ ; (F) repeated-measures one way ANOVA  $F_{(1,8)} = 26.843$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 9$ ) but display no significant difference in the investigation times between the 4<sup>th</sup> habituation trial (Hab4) and the test odor (Test) (see Fig. 1D, 1F). This reflects a lack of perceptual learning. (D) Habituation/dishabituation test for Octanal/Carvone of

WT mice showing significant habituation (repeated-measures one way ANOVA  $F_{(1,8)} = 93.596$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 9$ ) and spontaneous discrimination between the two odorants (significant difference between hab4 and test,  $p = 0.009$  with unilateral paired Student's  $t$  test). **(G-I)** A GFP-expressing lentivirus was injected into the SVZ of tamoxifen injected cKO mice. Twenty-eight days after, GFP labeled new neurons in the OB (green) were assessed for their FMRP immunoreactivity (red). The arrowheads indicate double-labeled new neurons. The arrow shows an FMRP immunonegative new neuron. Scale bar: 15  $\mu\text{m}$ .

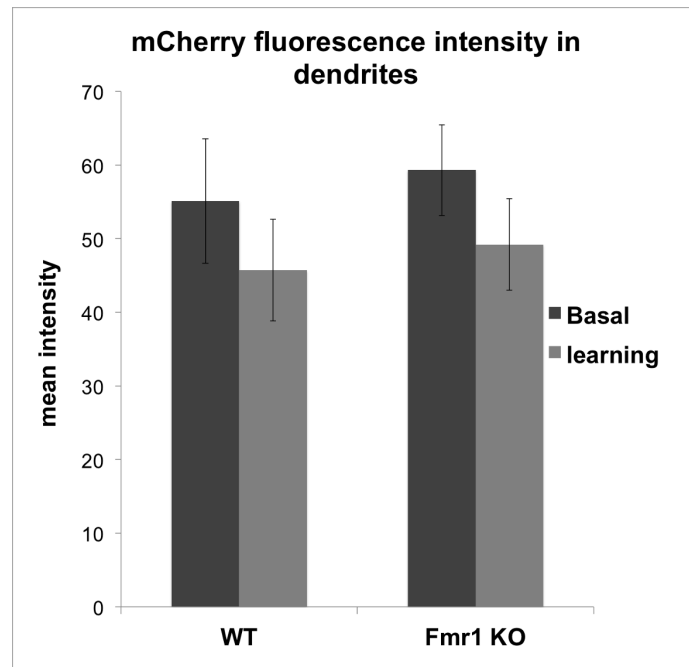


**Figure S2.** Post-enrichment habituation/dishabituation test for Lim<sup>+</sup> and Lim<sup>-</sup> of cKO mice injected with saline (**A**) or treated with MPEP (**B**) during the enrichment period. (**A**) Mice injected with saline show significant habituation (repeated-measures one way ANOVA  $F_{(1,10)} = 29.72$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 11$ ) but display no significant difference in the investigation times between the 4<sup>th</sup> habituation trial (Hab4) and the test odor (Test) (see Fig. 4A). This reflects a lack of perceptual learning. (**B**) Mice treated with MPEP show significant habituation ((**B**) repeated-measures one way ANOVA  $F_{(1,9)} = 57.059$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 10$ ) and a significant difference in the investigation times between the 4<sup>th</sup> habituation trial (Hab4) and the test odor (Test) (see Fig. 4B) indicating perceptual learning.



**Figure S3.** (A) Habituation/dishabituation test for Lim<sup>+</sup> and Lim<sup>-</sup> of Δ3'UTR mice after the enrichment period. They show significant habituation (repeated-measures one way ANOVA  $F_{(1,8)} = 87.55$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 9$ ) but display no significant difference in the investigation times between the 4<sup>th</sup> habituation trial (Hab4) and the test odor (Test) (see Fig. 5B). This reflects a lack of spontaneous discrimination between the two odorants. (B) Habituation/dishabituation test for Lim<sup>+</sup> and Lim<sup>-</sup> of D3'UTR mice after the enrichment period. They show significant habituation (repeated-measures one way ANOVA  $F_{(1,9)} = 42.71$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 10$ ) but display no significant difference in the investigation times between the 4<sup>th</sup> habituation trial (Hab4) and the test odor (Test) ((A)  $p = 0.263$  with a Wilcoxon paired test, (B) = 0.176 with paired Student's  $t$  test) indicating absence of perceptual learning.





**Figure S4.** Mean intensity of mCherry fluorescence in dendrites of new OB neurons in WT or *Fmr1* KO mice subjected or not to perceptual learning. mCherry fluorescence does not significantly vary between the different conditions, which allowed use as a normalizer. (Two-way ANOVA: Genotype effect,  $F_{(1,68)} = 4.13$ ,  $p = 0.522$ ; Learning effect,  $F_{(1,68)} = 2.18$ ,  $p = 0.144$ , Genotype–Learning interaction,  $F_{(1,68)} = 0.022$ ,  $p = 0.883$ ,  $n = 28-44-38-34$ ).

## Supplemental References

1. Scotto-Lomassese S, Nissant A, Mota T, Neant-Fery M, Oostra BA, Greer CA, *et al.* (2011): Fragile X Mental Retardation Protein Regulates New Neuron Differentiation in the Adult Olfactory Bulb. *J Neurosci.* 31:2205-2215.
2. Aakalu G, Smith WB, Nguyen N, Jiang C, Schuman EM (2001): Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron.* 30:489-502.
3. Mandairon N, Didier A, Linster C (2008): Odor enrichment increases interneurons responsiveness in spatially defined regions of the olfactory bulb correlated with perception. *Neurobiol Learn Mem.* 90:178-184.
4. Sholl DA (1953): Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat.* 87:387-406.



## **2. L'expression de $\alpha$ CamKII définit deux sous-populations de cellules granulaires, implication de ces deux populations dans l'apprentissage perceptif.**

Le laboratoire a observé que la moitié des cellules granulaires exprime  $\alpha$ CamKII, ce qui les divise en deux populations distinctes. Dans la continuité des résultats obtenus et présentés dans l'article de la 1<sup>ère</sup> partie, nous nous sommes alors penchés sur l'effet de l'apprentissage perceptif sur les deux populations de cellules granulaires. Dans un premier temps je ferai une brève introduction sur  $\alpha$ CamKII, puis j'exposerai les résultats obtenus par l'équipe (M. Néant-Ferry, S. Gribaudo, moi-même), en collaboration avec le laboratoire d' A. Saghatelian, à l'université Laval (S. Malvault, et L. David) démontrant l'existence de ces deux sous-populations et leurs différentes caractéristiques. Enfin, je présenterai mon travail sur les réponses différentes des deux sous-populations face à l'apprentissage perceptif.

### **2.1 Introduction**

#### **2.1.1 $\alpha$ CamKII est un régulateur clé de la plasticité synaptique et structurelle du cerveau en développement et adulte.**

##### **i. L'holoenzyme CamKII**

$\alpha$ CamKII est une sous unité de l'holoenzyme CamKII. CamKII est une Sérine Thréonine kinase fortement exprimée dans les neurones qui possède un rôle majeur dans la régulation de la plasticité synaptique (Shonesy, Jalan-Sakrikar, Cavener, & Colbran, 2014). Elle est composée de 12 sous-unités. Il existe 4 types de sous-unités de CamKII :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . Le dodécamère existe sous forme homo ou hétéromérique (Schulman, 2004). Chaque sous-unité fait entre 50 et 60 kDa et est composée de domaines C-ter et N-ter qui permettent l'activité enzymatique et l'association des sous-unités respectivement. Ces deux domaines très conservés entourent un domaine régulateur variable selon les sous-unités (Hudmon & Schulman, 2002). L'activité de CamKII dépend de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et des sous-unités qui la composent, puisque ses substrats varient en fonction de sa composition. CamKII est présente dans le cerveau et d'autres tissus. Seules les

sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont restreintes au cerveau et elles y sont les formes prédominantes (Liu & Murray, 2012).

ii. Rôles de  $\alpha$ CamKII dans la plasticité

$\alpha$ CamKII est un composant majeur de la densité post-synaptique.  $\alpha$ CamKII tient un rôle particulier dans la plasticité par rapport aux autres sous-unités de CamKII. Comme évoqué ci-dessus, son ARNm est transporté dans les neurites où il est traduit localement en réponse à l'activité (Håvik, Røkke, Bårdsen, Davanger, & Bramham, 2003).

a.  $\alpha$ CamKII est nécessaire à la LTP

$\alpha$ CamKII est nécessaire et suffisante à l'induction de la LTP dépendante des récepteurs NMDA (NMDAR) (Silva, Stevens, & Tonegawa, 1992). L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via les NMDAR induit la localisation de l'holoenzyme contenant  $\alpha$ CamKII au niveau de la synapse. CamKII se lie alors aux NMDAR et permet le recrutement des récepteurs AMPA à la surface synaptique (Shonesy et al., 2014). De plus, *in vivo*, la traduction locale synaptique de  $\alpha$ CamKII est nécessaire à la LTP hippocampique et à différents paradigmes d'apprentissage (Miller et al., 2002).

b.  $\alpha$  CamKII est nécessaire à la maturation et à la plasticité structurelle des épines dendritiques.

Dans des cultures de neurones d'hippocampe, l'accumulation de  $\alpha$ CamKII coïncide avec l'apparition d'épines sur les dendrites (Ahmed et al., 2006). De plus, l'accumulation d' $\alpha$ CamKII dans les filopodes ou proto-épines induit une stabilisation et maturation de l'épine (Ahmed et al., 2006). À l'inverse la diffusion d' $\alpha$ CamKII hors d'une épine mature induit une déstabilisation de l'épine qui se transforme en un filopode motile (Ahmed et al., 2006). La présence de  $\alpha$ CamKII semble ainsi impliquée dans la plasticité structurelle et la maturation des épines. Dans une autre étude réalisée sur tranches d'hippocampe, une forme d' $\alpha$ CamKII dont l'activité enzymatique est bloquée est toujours capable d'augmenter la taille des tête d'épines mais n'est plus capable de jouer sur la force synaptique (Pi et al., 2010). Donc, les effets d' $\alpha$ CamKII sur la plasticité synaptique et la morphologie des épines impliquent des mécanismes d'actions différents de l'enzyme. L'action d' $\alpha$ CamKII sur la morphologie des épines ne serait pas de nature enzymatique (Pi et al., 2010). Il a été

suggéré que  $\alpha$ CamKII pourrait augmenter le volume des épines grâce à son interaction avec les NMDAR (Leonard et al., 2002).

c.  $\alpha$ CamKII est impliquée dans la stabilisation dendritique pendant le développement

$\alpha$ CamKII est présente dans le cerveau en développement et l'altération de son expression est associée à des défauts dans le développement dendritique chez le Xénope et la souris. Chez le têtard de Xénope, l'augmentation de l'expression de CamKII coïncide avec une réduction de la croissance dendritique et la stabilisation prématurée de l'arborisation dendritique (Wu & Cline, 1998). À l'inverse, l'inhibition de CamKII augmente la complexité de l'arborisation dendritique (Zou & Cline, 1999). Pendant le développement du cerveau chez la souris, l'expression d' $\alpha$ CamKII est maximale pendant la période post-natale (Tang, Liu, Kuluz, & Hu, 2004). L'inhibition de l'activité d' $\alpha$ CamKII augmente la complexité de l'arborisation dendritique des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Pattinson et al., 2006).  $\alpha$ CamKII semble donc impliquée dans la stabilisation des dendrites des neurones en développement et son absence induit une dynamique trop importante du cytosquelette qui polymérise de manière excessive.

d.  $\alpha$ CamKII est impliquée dans la plasticité structurelle des nouveaux neurones du gyrus dentelé de l'hippocampe et du BO.

Un étude récente montre que la délétion d' $\alpha$ CamKII dans les cellules nouvellement générées du gyrus dentelé de l'hippocampe induit une augmentation de la complexité de l'arborisation dendritique de ces neurones (Arruda-Carvalho et al., 2014). Ces résultats suggèrent que  $\alpha$ CamKII agit sur la stabilisation dendritique des nouveaux neurones du gyrus dentelé de l'hippocampe de manière autonome cellulaire. De plus, les nouveaux neurones dépourvus d' $\alpha$ CamKII présentent aussi un nombre réduit de synapses matures associé à des défauts d'apprentissage spatial chez ces souris (Arruda-Carvalho et al., 2014). Par ailleurs, nos résultats montrent que la traduction locale de  $\alpha$ CamKII est nécessaire à l'apprentissage perceptif et à la plasticité structurelle des nouveaux neurones du BO (Daroles et al., 2015).

### 2.1.2 Hétérogénéité des cellules granulaires vis à vis de l'expression d' $\alpha$ CamKII.

#### i. La moitié des cellules granulaires du BO expriment $\alpha$ CamKII

##### a. Analyse des cellules granulaires du BO dans leur ensemble

$\alpha$ CamKII est exprimée dans le BO par les cellules granulaires (Néant-Fery et al., 2012). On la détecte dans la couche granulaire ainsi que dans la couche externe plexiforme, où les cellules granulaires étendent leurs dendrites (Fig. 1A,B). Elle n'est pas exprimée dans les cellules mitrales (Fig. 1B). La quantification de l'expression d' $\alpha$ CamKII dans les cellules granulaires a révélé que 50% d'entre elles expriment  $\alpha$ CamKII. De plus, il est important de noter que les cellules  $\alpha$ CamKII immuno-réactives ( $\alpha$ CamKII+) et immuno-négatives ( $\alpha$ CamKII-) sont réparties dans les parties profonde et superficielle de la couche granulaire de manière similaire.

##### b. Analyse des cellules nouvellement générées

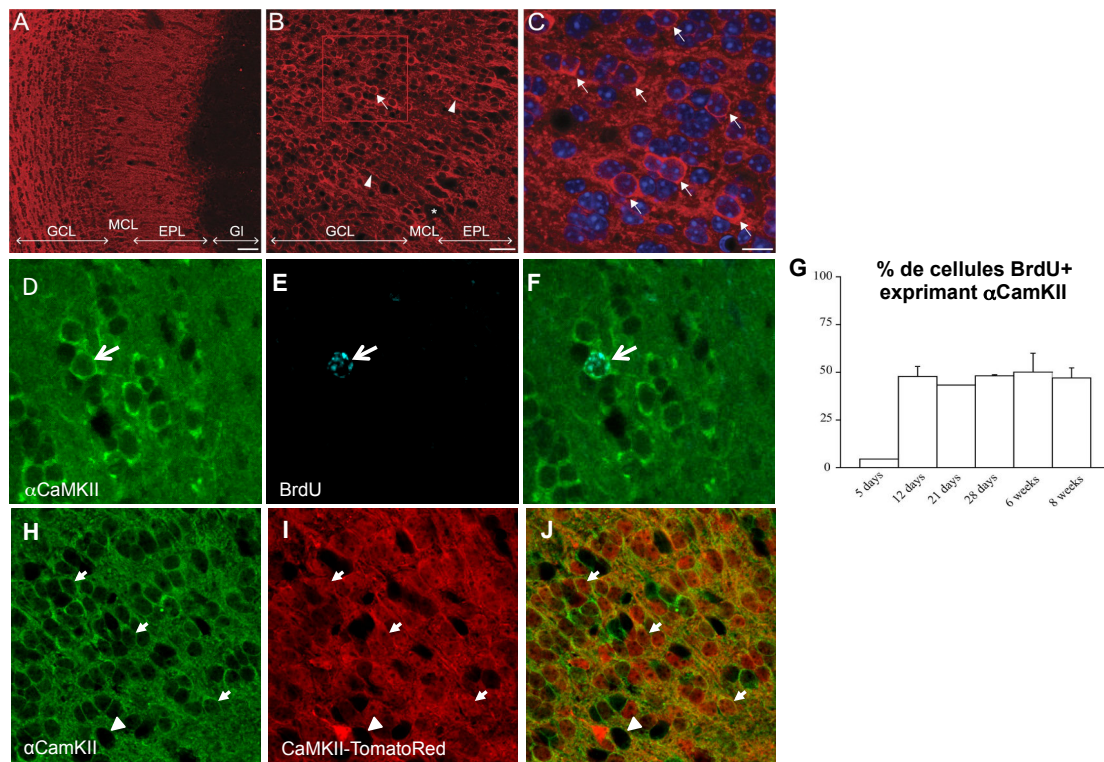
Sachant que les cellules granulaires sont les cellules renouvelées lors de la neurogénèse adulte dans le BO, nous avons analysé la proportion de nouveaux neurones exprimant  $\alpha$ CamKII. Pour cela, des souris adultes ont été injectées avec du BrdU et sacrifiées à différents temps après l'injection (5 jpi, 12 jpi, 21jpi, 28jpi, 6 semaines post-injection et 8 semaines post-injection). Des doubles immunomarquages anti-BrdU et anti- $\alpha$ CamKII ont été réalisés sur les coupes de BO de ces souris (Fig 1D-F). Le pourcentage de cellules  $\alpha$ CamKII immuno-réactives ( $\alpha$ CamKII+) ou non ( $\alpha$ CamKII-) parmi les cellules ayant incorporé du BrdU a été analysé. Ces comptages ont montré que parmi les cellules BrdU+ (nouvellement générées), 50% expriment  $\alpha$ CamKII et ce pourcentage est constant quel que soit l'âge des nouveaux neurones, de 12 jours jusqu'à 8 semaines au moins (Fig. 1G).

#### ii. Les cellules granulaires $\alpha$ CamKII+ et $\alpha$ CamKII- sont deux populations distinctes

L'hétérogénéité des cellules granulaires vis à vis de l'expression de  $\alpha$ CamKII peut être interprétée de deux manières : (1) deux sous-populations de cellules granulaires existent dans le BO, l'une exprimant  $\alpha$ CamKII, l'autre pas. Cependant on ne peut pas exclure que (2) la proportion de cellules exprimant  $\alpha$ CamKII reste constante, mais que chaque cellule puisse exprimer  $\alpha$ CamKII de façon transitoire. Pour cela, nous

avons utilisé des souris fournies par le laboratoire de M. Holzemberg, dans lesquelles l'expression de la protéine TomatoRed est induite par une Cre recombinase sous le promoteur de  $\alpha$ CamKII ( $\alpha$ CamKII-Cre;Rosa::LoxStopLox-TomatoRed, souris  $\alpha$  CamKII-Tomato dans la suite du texte). Dans ces conditions, l'expression de la protéine TomatoRed est stable dans les cellules. Ainsi, une cellule qui commence à exprimer  $\alpha$ CamKII exprimera TomatoRed tout au long de sa vie. Dans ces souris, 93% des cellules granulaires qui expriment TomatoRed sont aussi  $\alpha$ CamKII+ et 94% des cellules granulaires  $\alpha$ CamKII+ expriment aussi TomatoRed (Fig. 1I-K). Ce résultat indique que l'expression de  $\alpha$ CamKII est constante au cours de la vie de la cellule. On peut donc classer les cellules granulaires en deux sous-populations distinctes l'une exprimant  $\alpha$ CamKII, l'autre pas.



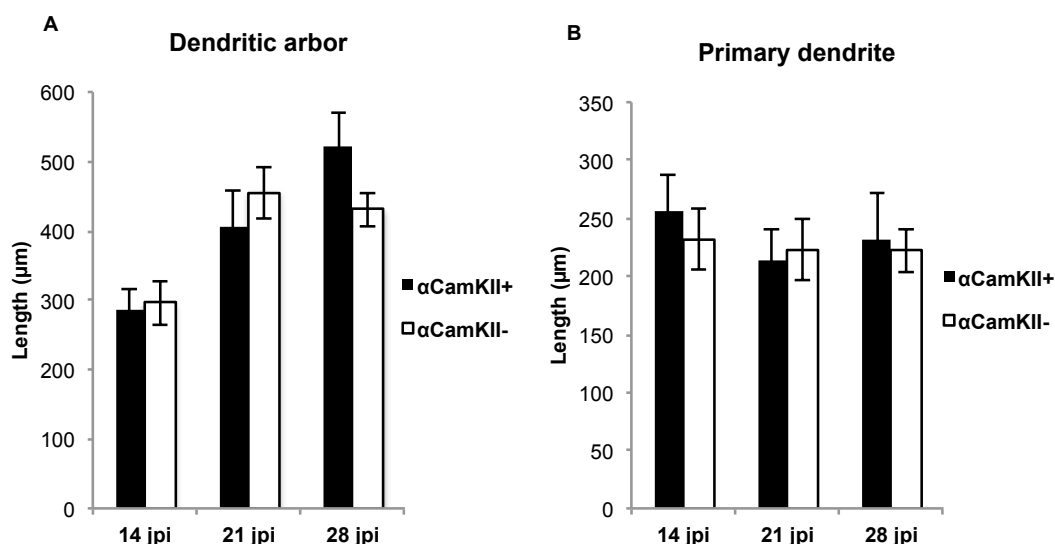


**Figure 9 : Les cellules granulaires  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> et  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup> sont deux populations distinctes.** Immunofluorescence anti- $\alpha$ CamKII sur coupe de BO : À faible grossissement son expression est détectable dans la couche granulaire, et la couche plexiforme externe (**A**). À plus fort grossissement (**B**), on observe  $\alpha$ CamKII dans les cellules granulaires où elle est détectable dans les corps cellulaires (flèches) et dans les dendrites (têtes de flèche). Elle est absente des cellules mitrales (étoile). À plus fort grossissement encore (**C**), on peut voir que toutes les cellules granulaires n'expriment pas  $\alpha$ CamKII. Les flèches pointent des cellules exprimant  $\alpha$ CamKII. A-C : *résultats générés par M. Néant-Fery* GCL : couche des cellules granulaires ; MCL : couche des cellules mitrales ; EPL : couche plexiforme externe ; GL : couche glomérulaire. **D** à **F** : Double immunofluorescence anti- $\alpha$ CamKII (vert) et anti-BrdU (cyan) sur coupe de BO. **G** : Quantification de la co-détection de BrdU et  $\alpha$ CamKII dans les cellules granulaires. Quel que soit l'âge des nouveaux neurones, de 12 jours à 8 semaines, 50% d'entre eux expriment  $\alpha$ CamKII. D-G : *Résultats générés par le laboratoire d'A. Saghatelian*. **H** à **J** : Co-détection de  $\alpha$ CamKII (vert) et Tomato (rouge) sur coupe de BO des souris  $\alpha$ CamKII-Cre;Rosa::LoxStopLox-TomatoRed. Plus de 90% des neurones TomatoRed<sup>+</sup> sont  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> et inversement. Les flèches montrent des neurones  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> et TomatoRed<sup>+</sup>. La tête de flèche montre une cellule  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup> et Tomato Red<sup>-</sup>. H-J : *résultats générés par S.Gribaudo*.

iii. Caractéristiques morphologiques et excitabilité des cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> et  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup>.

a. Les deux sous-populations ne présentent pas de différences morphologiques

Étant donné le rôle  $\alpha$ CamKII, dans la structure des neurones en développement (G. Y. Wu & Cline, 1998; Zou & Cline, 1999) et des nouveaux neurones de l'hippocampe (Arruda-Carvalho et al., 2014), la morphologie des nouveau neurones  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> et  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup> du BO de souris adultes a été analysée 14, 21 ou 28 jours après injection dans la ZSV d'un lentivirus porteur de la GFP. Quel que soit l'âge des neurones, l'analyse morphologique n'a pas révélé de différence significative entre les deux sous-populations (Fig. 3).

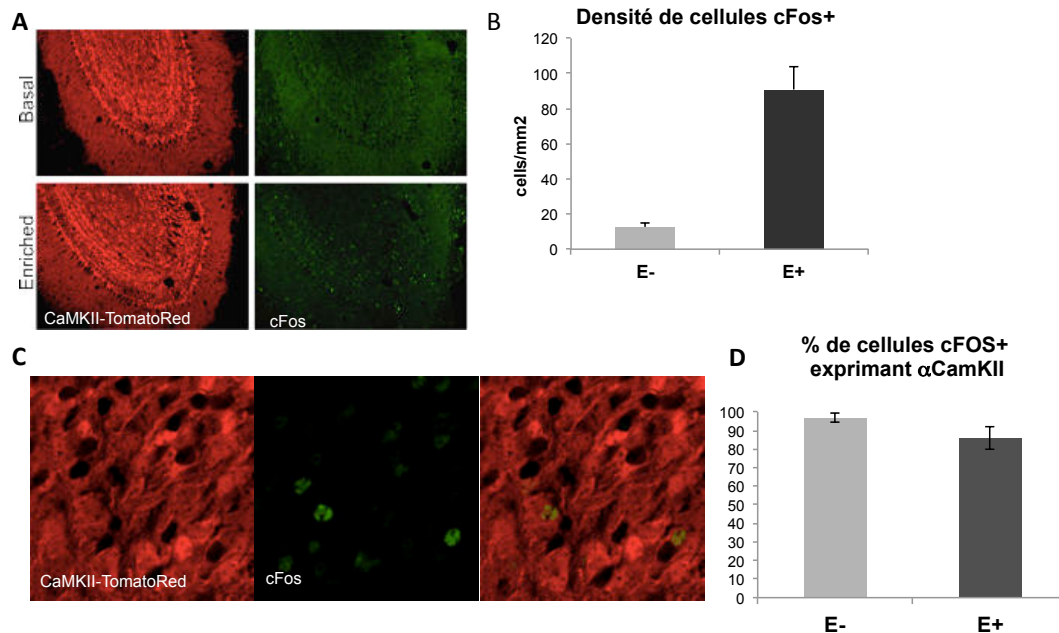


**Figure 10 : Les deux sous-populations ne présentent pas de différences morphologiques.** Analyse morphologique des cellules granulaires  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> et – à 14, 21, et 28 jpi. La longueur de l'arborisation dendritique (A) et la longueur du dendrite primaire (B) ne sont pas différentes entre les deux populations quel que soit l'âge des neurones. jpi : jours post-injection. Résultats générés par S.Gribaudo.

b. Les deux sous-populations présentent une différence d'excitabilité

c-Fos est un gène précoce immédiat dont l'expression est interprétée comme signe d'activation des neurones. Afin de tester l'excitabilité des cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> et  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup>, des immuno-marquages anti-c-Fos ont été réalisés sur des coupes de BO de souris  $\alpha$ CamKII-Tomato (Fig. 2A,C) en condition basale et après une stimulation olfactive d'1heure. Lors d'une stimulation olfactive, la densité de cellules granulaires qui expriment c-Fos est augmentée de 10 fois (Fig. 4A,B). À l'état basal, l'expression de c-Fos, est préférentiellement détectée dans les cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> : 90% des

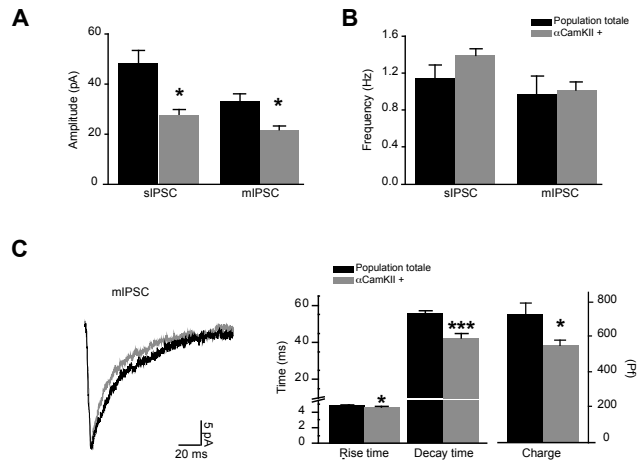
cellules granulaires qui expriment c-Fos sont  $\alpha$ CamKII+ (Fig. 4D). De même, le pourcentage de cellules c-Fos qui expriment  $\alpha$ CamKII après une stimulation olfactive est de 90% (Fig. 4A). Ceci suggère que les cellules granulaires  $\alpha$ CamKII+ sont préférentiellement activées à l'état basal et lors d'une stimulation olfactive aigue.



**Figure 11 : Les neurones activés sont préférentiellement des cellules granulaires  $\alpha$ CamKII+.** (A) Après stimulation olfactive, la densité de noyau c-Fos+ est multipliée par 10 par rapport à l'état basal. (B) À l'état basal (E-), ou après stimulation olfactive (E+), 90% des neurones qui expriment c-Fos expriment  $\alpha$ CamKII. *Résultats générés par S. Gribaudo.*

Ces résultats ont été confirmés par l'analyse des courants inhibiteurs enregistrés sur les cellules granulaires. Des souris C57Bl/6 adultes ont été injectées dans le CMR avec un adeno-associated-virus (AAV) porteur de la GFP sous le promoteur d' $\alpha$ CamKII de façon à marquer des nouveaux neurones  $\alpha$ CamKII+. Un autre groupe de souris a reçu un AAV porteur de la GFP sous le promoteur de  $\beta$ -actine qui va donc s'exprimer dans l'ensemble des cellules granulaires indépendamment de l'expression de  $\alpha$ CamKII. L'analyse électrophysiologique des neurones exprimant la GFP a été réalisée deux semaines après injection. L'amplitude des potentiels post-synaptiques inhibiteurs spontanés (sIPSC) et miniatures (mIPSC) des cellules  $\alpha$ CamKII+ est plus faible que dans la population totale des cellules granulaires (Fig. 4A). En revanche, leur fréquence est la même (Fig.4B). Ceci suggère une conductance plus faible des récepteurs GABA présents ou un moins grand nombre de récepteurs GABA sur les cellules  $\alpha$ CamKII+ par rapport aux cellules  $\alpha$ CamKII-. La cinétique des miniatures (Fig. 4C) est aussi différente suggérant que les récepteurs

GABA présents sur cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> et  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup> ne sont pas composés des mêmes sous-unités. Ces analyses montrent que les cellules granulaires  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> sont moins inhibées que les cellules  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup> à l'état basal.



**Figure 12: Caractérisation électrophysiologique des cellules granulaires  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> en comparaison à la population totale.** L'analyse des sIPSC et mIPSC montre que (A) leurs amplitudes sont plus faibles dans les cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> que dans la population totale. (B) la fréquence des sIPSC et mIPSC des cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> n'est pas différentes par rapport à la population totale. (C) : L'analyse de la cinétique des mIPSC révèle une différence des cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> par rapport à la population totale. *Résultats générés par le laboratoire d'A.Saghatelian.*

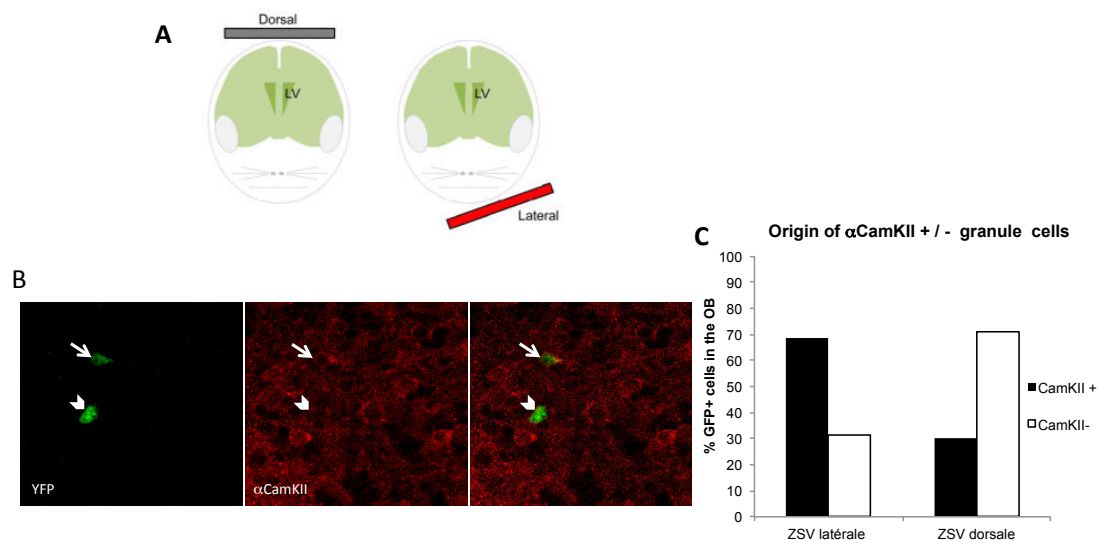
L'ensemble de ces résultats suggère que deux sous-populations de cellules granulaires coexistent dans la couche granulaire : des cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> et  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup>. Ces deux populations sont équivalentes en terme de nombre et de répartition dans la couche granulaire. Les cellules  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup> semblent avoir un seuil d'excitabilité plus élevé que les cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup>. Étant donné le rôle de la traduction locale de  $\alpha$ CamKII dans l'apprentissage perceptif (partie 1), nous nous sommes alors intéressées au rôle de ces deux populations dans ce paradigme.

## 2.2 Résultats

### 2.2.1. Les deux populations proviennent de régions différentes de la SVZ.

Il est connu que les cellules granulaires du BO sont une population hétérogène et il a été montré que les différentes populations identifiées proviennent de différentes régions de la ZSV (Lim & Alvarez-buylla, 2014). En collaboration avec le laboratoire

d'O. Raineteau, nous avons identifié l'origine dans la ZSV des deux sous-populations. Des souris transgéniques, Rosa26::LoxPSTOPLoxP-YFP, âgées de deux jours ont été électroporées au niveau de la ZSV dorsale ou latérale à l'aide d'un plasmide porteur du gène de la Cre recombinase (Fig 5A). De cette manière, dans le BO, les cellules YFP positives proviennent soit de la ZSV latérale soit la ZSV dorsale. Un double marquage des coupes de BO à l'aide d'anticorps anti-GFP et anti- $\alpha$ CamKII (Fig. 5B) a alors montré que la majorité des cellules qui proviennent de la ZSV latérale sont  $\alpha$ CamKII+ (70%) (Fig. 5C) tandis que la majorité des cellules qui proviennent de la ZSV dorsale sont  $\alpha$ CamKII- (70%) (Fig. 5C) ( $\chi^2 = 80.146$ ,  $df=1$ ,  $p\text{-value} < 0,0001$ ). Ceci suggère que les cellules  $\alpha$ CamKII+ et  $\alpha$ CamKII- proviennent de régions différentes de la ZSV. Elles pourraient donc être générées par des progéniteurs localisés de manière différentielle.



**Figure 13 : Les cellules granulaires  $\alpha$ CamKII+ et  $\alpha$ CamKII- proviennent de régions différentes de la SVZ.** **A** : Schéma représentant la localisation des électrodes positives lors de l'électroporation du plasmide. *Tiré de Fernandez et al, 2011.* **B,C** : Un plasmide porteur du gène de la Cre recombinase a été électroporé dans la ZSV latérale ou dorsale de souris de deux jours. Un mois et demi plus tard les souris sont sacrifiées. *Réalisé dans le laboratoire d'O. Raineteau.* **B** : L'immunoréactivité pour  $\alpha$ CamKII (rouge) des neurones marqués par la YFP (vert) dans le BO a été observée. La flèche pointe un neurone YFP+  $\alpha$ CamKII+. La tête de flèche montre un neurone YFP+  $\alpha$ CamKII-. **C** : quantification du pourcentage de cellules YFP dans le BO provenant de la ZSV latérale ou dorsale exprimant ou non  $\alpha$ CamKII.  $\chi^2 = 80.146$ ,  $df = 1$ ,  $p\text{-value} < 0,0001$ .

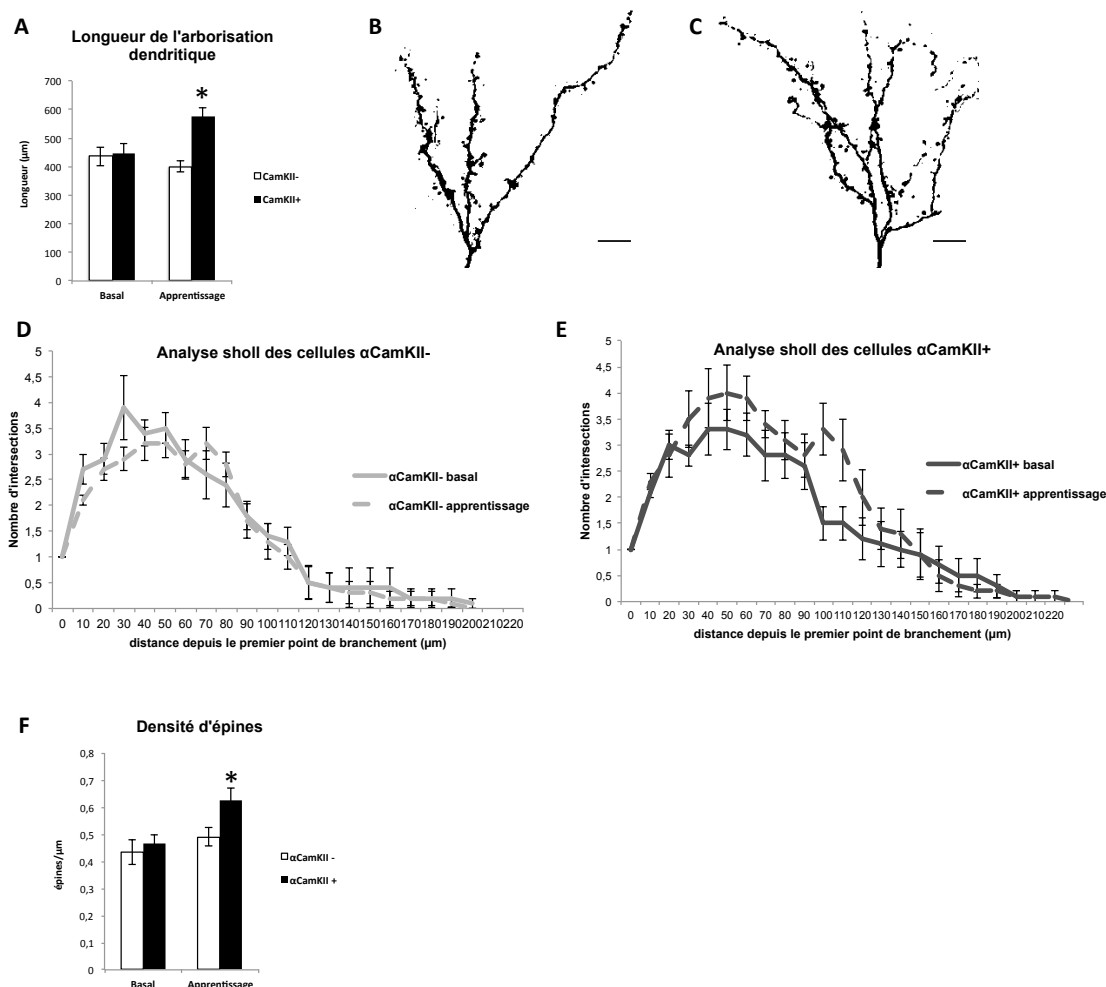
### 2.2.2. Effets de l'apprentissage perceptif sur les deux populations.

Nous avons montré précédemment que l'apprentissage perceptif induit une plasticité structurelle importante des cellules granulaires, ainsi que le rôle de la traduction locale de  $\alpha$ CamKII dans cette plasticité. Nous avons donc étudié le comportement des deux populations,  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> et  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup>, pendant l'apprentissage perceptif.

- i. La plasticité structurelle des nouveaux neurones du BO associée à l'apprentissage est induite dans les cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> uniquement.

Des souris adultes ont été injectées dans la ZSV à l'aide d'un virus porteur de la GFP, puis soumises à un apprentissage perceptif (comme décrit dans la partie 1). À la suite de l'exposition quotidienne au lim<sup>+</sup> et lim<sup>-</sup>, nous avons réalisé l'analyse morphologique des cellules granulaires exprimant la GFP en vérifiant leur identité  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> ou  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup> par immunofluorescence anti- $\alpha$ CamKII. Comme observé précédemment (Fig. 3), à l'état basal, la taille de l'arborisation dendritique des cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> et  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup> n'est pas différente ( $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> :  $445,7 \pm 36 \mu\text{m}$  ;  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup> :  $435,8 \pm 32,7 \mu\text{m}$  ;  $p=0,557$ ) (Fig. 6A). Après apprentissage, les cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> présentent une arborisation dendritique plus longue ( $577,6 \pm 27 \mu\text{m}$  ;  $p<0,0001$ ) (Fig. 6A et C) et plus complexe ( $p=0,01$ ) (Fig. 6C et E) par rapport à l'état basal. En revanche, l'arborisation dendritique des cellules  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup> après apprentissage reste inchangée par rapport à l'état basal ( $400,6 \pm 19 \mu\text{m}$  ;  $p=0,696$ ) (Fig. 6A, B et D).

À l'état basal, la densité d'épines dendritiques dans les cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> et  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup> n'est pas différente ( $\alpha$ CamKII<sup>-</sup> :  $0,43 \pm 0,04$  épines/ $\mu\text{m}$  ;  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> :  $0,46 \pm 0,03$  épines/ $\mu\text{m}$  ;  $p=0,054$ ). Après apprentissage, la densité d'épines augmente uniquement dans les cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> ( $\alpha$ CamKII<sup>-</sup> :  $0,49 \pm 0,03$  épines/ $\mu\text{m}$  ;  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> :  $0,63 \pm 0,04$  épines/ $\mu\text{m}$  ;  $p=0,002$ ) (Fig. 6C). Ces résultats montrent que la plasticité structurelle associée à l'apprentissage perceptif se produit uniquement dans les cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup>. Ceci suggère que la présence de  $\alpha$ CamKII est nécessaire à la plasticité structurelle associée à l'apprentissage. Ceci signifie également que dans l'étude présentée dans la partie 1, les changements morphologiques associés à l'apprentissage que nous rapportons sont dilués dans une population hétérogène de cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> (qui sont modifiées) et  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup> (qui ne le sont pas).



**Figure 14 : La plasticité structurale des nouveaux neurones du BO associée à l'apprentissage est induite dans les cellules αCamKII+ uniquement.** Des souris adultes ont été injectées dans la ZSV avec un lentivirus porteur de la GFP, puis soumises ou non à l'apprentissage perceptif. L'analyse morphologique des neurones GFP+ a été réalisée en prenant en compte de l'identité des cellules grâce à une immunofluorescence anti-αCamKII. **A** : La taille de l'arborisation dendritique à l'état basal n'est pas différente dans les deux sous-populations. Après apprentissage, seule l'arborisation des cellules αCamKII+ augmentent en taille. ANOVA deux facteurs (expression ( $F_{(1,42)}=10,63$  ,  $p=0,002$  ; apprentissage  $F_{(1,42)}=3,09$  ,  $p=0,086$  ; interaction  $F_{(1,42)}=6,97$  ,  $p=0,012$ ). **B** et **C** : Images représentatives binarisées de l'arborisation dendritique de cellules granulaires αCamKII- (**B**) et αCamKII+ (**C**) après apprentissage. **D** et **E** : Analyse sholl de la complexité dendritique de neurones. L'origine des rayons concentriques a été placée sur le premier point de branchement. (**D**) La complexité de l'arborisation dendritique des neurones αCamKII- reste inchangée après apprentissage par rapport à l'état basal. ANOVA deux facteurs sur mesures répétées ( $p$  non significative). (**E**) En revanche les neurones αCamKII+ ont une arborisation dendritique plus complexe après apprentissage. ANOVA deux facteurs sur mesures répétées ( $p=0,047$ ). **F** : La densité d'épines dendritique n'est pas différentes entre les cellules αCamKII+ et αCamKII- à l'état basal ( $p=0,054$ ). Après apprentissage, la densité d'épines augmente uniquement sur les cellules αCamKII+ ( $p=0,002$ ). ANOVA deux facteurs (expression ( $F_{(1,36)}=9,09$  ,  $p=0,005$  ; apprentissage  $F_{(1,36)}=13,76$  ,  $p=0,001$  ).

ii. L'apprentissage perceptif induit l'activation des cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> et -.

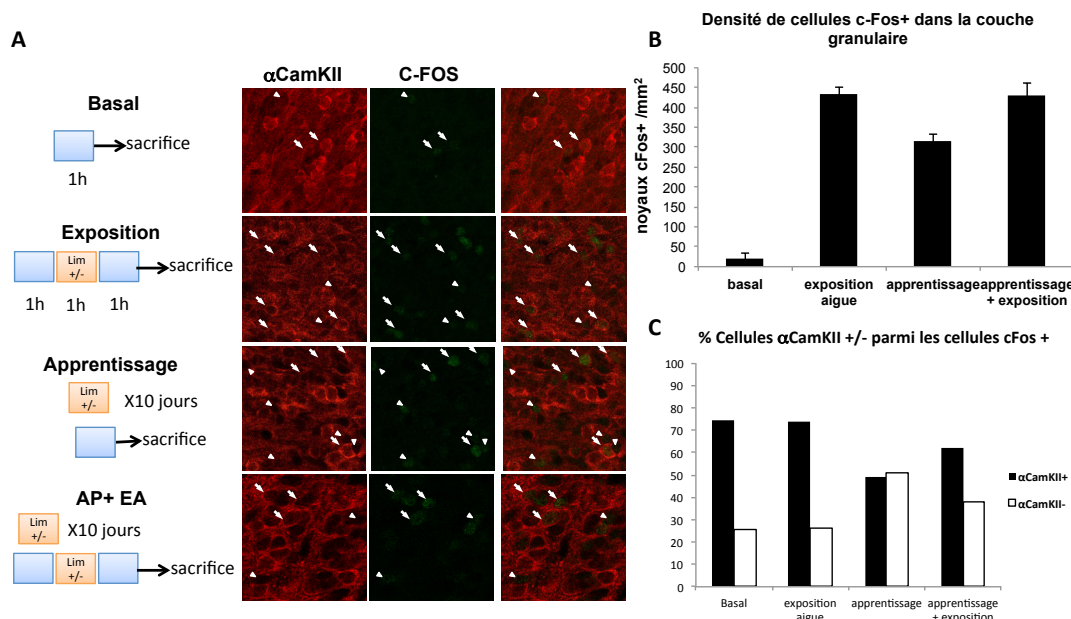
Nous avons ensuite analysé l'activation des cellules granulaires en réponse à l'apprentissage. 12 souris ont été réparties en quatre groupes : 1) 3 souris n'ont pas été exposées aux odorants, 2) 3 souris ont été exposées 1h avant le sacrifice au lim<sup>+</sup> et au lim<sup>-</sup>, 3) 3 souris ont été soumises à l'apprentissage perceptif pendant 10 jours puis sacrifiées, et enfin 4) 3 souris ont été soumises à l'apprentissage perceptif pendant 10 jours et ont été exposées au lim<sup>+</sup> et lim<sup>-</sup> 1h avant le sacrifice. En accord avec les résultats déjà obtenus, après une stimulation olfactive aigue aux odorants (2), la densité de cellules qui expriment c-Fos est augmentée très fortement par rapport à l'état basal (1) (Basal :  $19 \pm 16$  cellules/mm<sup>2</sup>; exposition aigue :  $434 \pm 16$  cellules/mm<sup>2</sup>;  $p < 0,0001$ ) (Fig. 7B). Après apprentissage (3) la densité de cellules c-Fos<sup>+</sup> est aussi largement augmentée par rapport à l'état basal (apprentissage :  $314 \pm 19$  cellules/mm<sup>2</sup>;  $p < 0,001$ ) (Fig. 7B). Après apprentissage et réexposition aux deux odorants avant sacrifice, la densité est similaire à celle d'une exposition aigue ( $430 \pm 31$  cellules/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,903$ ) (Fig. 7B). Nous avons alors observé l'immuno-marquage de c-Fos dans la couche granulaire du BO, couplé à un immuno-marquage anti- $\alpha$ CamKII. De manière similaire à ce qui a été observé précédemment (Fig. 3), à l'état basal (1) et après une exposition aigue aux odorants (2), 75% des cellules c-Fos<sup>+</sup> sont  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup>. De manière très intéressante, après apprentissage perceptif (3), le pourcentage de cellules cFos<sup>+</sup> exprimant  $\alpha$ CamKII est diminué à 49% ( $p < 0,001$ ). Enfin, après réexposition aux odorants des souris déjà soumises à l'apprentissage perceptif (4), 62% des cellules cFos<sup>+</sup> sont  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> (Fig. 7A,C).

Ces résultats indiquent qu'une exposition aigue aux lim<sup>+</sup> et lim<sup>-</sup>, active préférentiellement les cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup>. En revanche, l'apprentissage perceptif active autant les cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> que les  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup>.

Ces résultats montrent que l'apprentissage perceptif agit sur les deux populations de cellules granulaires que nous avons identifiées, mais que ces effets sont différents sur les deux populations. Les cellules  $\alpha$ CamKII<sup>+</sup> subissent un allongement de leur arborisation dendritique et une augmentation du nombre de synapses au niveau de cette arborisation. Les cellules  $\alpha$ CamKII<sup>-</sup>, ne subissent pas ces changements structurels, mais sont plus facilement activables après apprentissage perceptif qu'à l'état basal.



En parallèle, nos collaborateurs ont analysé l'activation des deux populations de cellules granulaires dans deux autres paradigmes : un apprentissage associatif faisant appel à la mémoire de long-terme et un test de la mémoire de court-terme. Il s'avère que seul l'apprentissage faisant appel à la mémoire de long-terme active davantage de cellules  $\alpha$ CamKII- qu'à l'état basal. Il semblerait donc que les cellules  $\alpha$ CamKII- sont préférentiellement activées lors d'un processus d'apprentissage sur le long terme tandis que les cellules  $\alpha$ CamKII+ seraient impliquées dans les tâches olfactives à court terme.



**Figure 15 : L'apprentissage perceptif active les neurones  $\alpha$ CamKII+ et -. A :** Double immunofluorescence anti- $\alpha$ CamKII (rouge) et anti-c-Fos (vert) sur coupes de BO de souris en condition basale, d'exposition au lim+ et lim-, d'apprentissage et d'apprentissage avec réexposition au lim+ et lim-. **B :** Densité des neurones c-Fos+ dans la couche granulaire du BO. À l'état basal, la densité de noyaux c-Fos+ est de  $19 \pm 16$  cellules/ mm<sup>2</sup>. Après exposition aigüe au lim+ et lim-, cette densité augmente jusqu'à atteindre  $434 \pm 16$  cellules/ mm<sup>2</sup>. Après apprentissage perceptif sans stimulation, la densité est de  $314 \pm 19$  cellules/ mm<sup>2</sup>. Enfin, après apprentissage et réexposition au lim+ et lim-, la densité retourne à une valeur de  $430 \pm 31$  cellules/ mm<sup>2</sup>. ANOVA ( $F_{(3,7)}=58,4$  ;  $p<0,0001$ ). AP : apprentissage perceptif. EA : exposition aigüe. **C :** Quantification de la co-expression de  $\alpha$ CamKII et c-Fos dans les 4 conditions expérimentales. En condition basale et après une exposition au lim+ et lim-, 75% des neurones c-Fos+ sont  $\alpha$ CamKII+. Après la phase d'apprentissage, sans stimulation olfactive, 49% des neurones c-Fos+ sont  $\alpha$ CamKII+. Enfin, après apprentissage et réexposition au lim+ et lim-, 62% des neurones c-Fos+ sont  $\alpha$ CamKII+.  $\chi^2$  ;  $p$ -value < 0,0001.

## 2.3 Matériel et méthodes

Certaines des techniques utilisées dans cette partie ont déjà été décrites dans la partie 1 des résultats. Je n'expliquerai donc ici uniquement celles qui n'ont pas encore été évoquées précédemment.

i. Exposition aigue aux odorants

Avant l'exposition, la sciure de la cage des souris est changée et les souris sont laissées 1h au propre. Les souris sont ensuite exposées pendant 1h à deux morceaux de mouchoirs imbibés de lim+ ou lim- chacun dans une boule à thé. Enfin les souris sont sacrifiées 1h après la fin de l'exposition.

ii. Immunofluorescences

Les perfusions et la préparation des tissus à l'immunofluorescence ont été réalisées comme décrit dans la partie 1 des résultats. Dans cette partie nous avons, en plus, utilisé les anticorps :

1. anti-  $\alpha$ CamKII (clone 6G9 de chez thermofischer) dilué 500X
2. anti-cFos (de chez Santa Cruz) dilué 40 000X

dans la solution de saturation décrite dans la partie 1.

## **Discussion**



## **1. Le rôle de FMRP et de la traduction locale d' $\alpha$ CamKII dans la plasticité structurelle des nouveaux neurones du BO associée à l'apprentissage olfactif.**

L'essentiel de cette partie de la discussion est développée dans la discussion l'article ci-dessus. Je me contenterai donc d'ajouter quelques points qui n'y sont pas présents.

### **1.1. Le rôle de FMRP dans la plasticité structurelle associé à l'apprentissage perceptif.**

#### **i. La plasticité exceptionnelle des nouveaux neurones du BO.**

Au cours de cette étude, nous avons pu observer que l'apprentissage perceptif induit des remodelages dendritiques de grande échelle des nouveaux neurones du BO. On sait aujourd'hui que les cellules granulaires du BO font preuve d'une plasticité inégalée dans le cerveau adulte (Mizrahi, 2007). La plasticité structurelle que nous observons semble comparable à celle observée dans les nouveaux neurones du gyrus dentelé de l'hippocampe lors d'un apprentissage spatial (Tronel et al., 2010). Cette plasticité dendritique extraordinaire dans le cerveau adulte apparaît comme réservée aux «jeunes» neurones qui possèdent des caractéristiques développementales. Cette plasticité ne peut se faire en absence de FMRP dans ces neurones. Étant donné le rôle développemental de FMRP dans la régulation de l'élaboration dendritique en réponse à l'activité chez la drosophile (C. a. Doll & Broadie, 2015) et dans les périodes critiques de développement cortical chez la souris (Harlow et al., 2010), il n'est pas étonnant qu'elle soit aussi importante dans le développement dendritique des jeunes neurones du cerveau adulte en réponse à un apprentissage.

#### **ii. Les défauts d'apprentissage chez les souris cKO**

L'utilisation de souris *Fmr1* cKO inductibles par injection de tamoxifène m'a permis de montrer que FMRP dans les nouveaux neurones est nécessaire à l'apprentissage perceptif. Dans ces souris, j'ai pu induire la recombinaison du gène *Fmr1* dans 37%

des nouveaux neurones, ce qui est un taux relativement faible. Pourtant, ceci est suffisant pour induire des défauts observables au niveau comportemental. Une étude réalisée par le laboratoire de P-M. Lledo montre que l'activation de nouveaux neurones infectés par injection d'un lentivirus porteur du gène de la channelrhodopsine suffit à augmenter les performances lors d'un apprentissage de discrimination olfactive (Alonso et al., 2012), alors même que le nombre de cellules infectées est faible et que seuls 6% d'entre eux sont activés par la lumière. Il semblerait donc que cibler même un nombre faible de nouveaux neurones affecte le réseau du BO suffisamment pour modifier les capacités d'apprentissage dans un sens ou dans l'autre.

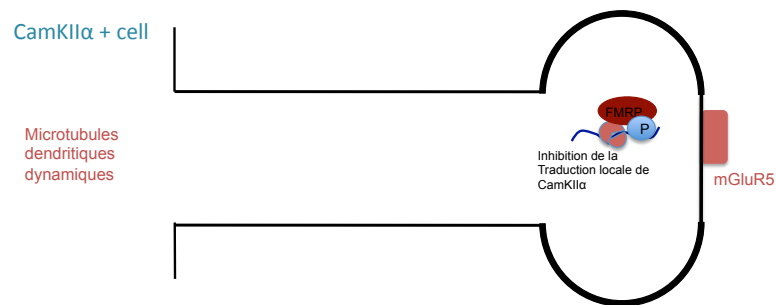
### 1.2. Le MPEP sauve les défauts d'apprentissage et de plasticité des souris cKO.

De récentes études cliniques sur des patients SXF montrent des effets décevants de différents antagonistes des récepteurs mGluR5 (Scharf et al., 2014). Dans notre étude, un traitement par un antagoniste des récepteurs mGluR5, le MPEP, pendant la période d'exposition aux odorants suffit à restaurer l'apprentissage et la plasticité structurelle associée. On peut expliquer ceci de différentes manières. Tout d'abord, nous avons sauvé le phénotype de souris dans lesquelles la mutation est induite dans une sous-population de neurones du BO, ce qui semble plus facile que de sauver le phénotype d'un réseau touché par la mutation dans sa globalité. D'autre part, comme évoqué précédemment, ces neurones sont jeunes et extrêmement plastiques, puisqu'au moment du traitement, ils sont en pleine période critique (Nissant & Pallotto, 2011). Les études cliniques ont été réalisées sur des patients adultes chez lesquels toutes les périodes critiques majeures sont terminées. De plus, le traitement en question, consistait en une injection unique. Un traitement sur la durée et sur des sujets plus jeunes pourrait peut être avoir des effets bénéfiques (Gross et al., 2015).

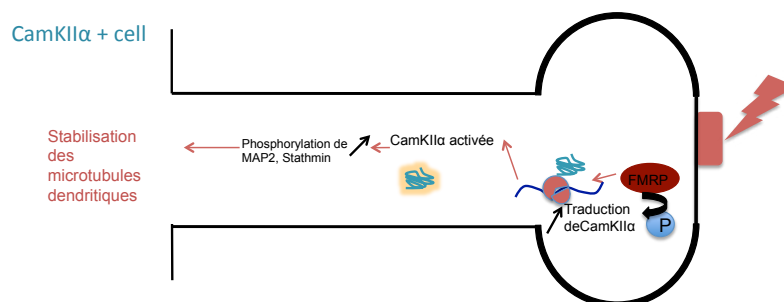
### 1.3. Le modèle proposé

L'ensemble des résultats présentés dans l'article nous permet de proposer un modèle dans lequel, à l'état basal, FMRP inhibe la traduction locale d' $\alpha$ CamKII. Dans

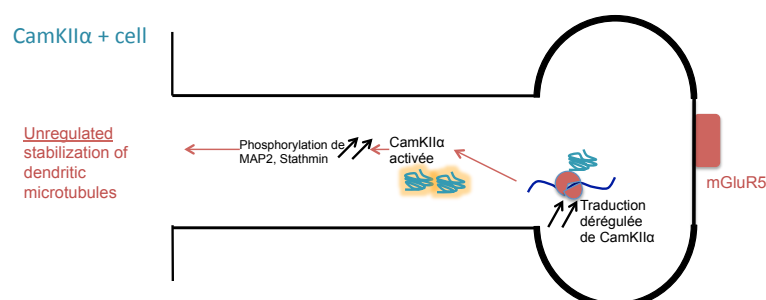
ces conditions, les microtubules dendritiques des cellules granulaires sont dynamiques.



Lors d'une stimulation olfactive, les récepteurs mGluR5 des épines dendritiques des cellules granulaires sont activés et induisent la déphosphorylation de FMRP. FMRP se détache alors de l'ARNm d' $\alpha$ CamKII et permet sa traduction.  $\alpha$ CamKII phosphoryle ses substrats comme stathmine et MAP2 (Fukunaga, Muller, & Miyamoto, 1996; Ohkawa, Fujitani, Tokunaga, Furuya, & Inokuchi, 2007; Takemura et al., 1992) qui alors stabilisent les microtubules, permettant un allongement progressif des dendrites au fil des stimulations odorantes.



En absence de FMRP,  $\alpha$ CamKII, est synthétisée de manière dérégulée sans besoin de stimulation des récepteurs mGluR5. Ceci induit une stabilité constante et trop importante des microtubules qui empêche tout remodelage dendritique.





Ce modèle, peut être simpliste, nous permet d'expliquer les effets observés sur les dendrites. Afin de tester ce modèle, des expériences pourraient être réalisées. Tout d'abord, notre étude ne permet pas de conclure que la régulation de la traduction locale de  $\alpha$ CamKII par FMRP est responsable de l'apprentissage et de la plasticité que l'on observe. Dans ce but, il faudrait cibler la séquence de reconnaissance de FMRP sur l'ARNm d' $\alpha$ CamKII. À l'aide de la technologie Crispr, on pourrait supprimer le G-quartet présent sur le 3'UTR d' $\alpha$ CamKII dans les jeunes neurones (Subramanian et al., 2011) et analyser leur plasticité en réponse à un apprentissage perceptif. Ensuite, afin de prouver l'impact de la signalisation via les mGluR5 sur la traduction locale de  $\alpha$ CamKII dans nos conditions, il serait intéressant de tester l'effet du MPEP sur le rapporteur de traduction de  $\alpha$ CamKII en condition basale et d'apprentissage chez les souris *Fmr1* KO. Enfin, l'observation des dendrites des cellules granulaires par microscopie bi-photons sur animaux vivant permettrait de tester l'impact de l'apprentissage et de l'absence de FMRP sur la dynamique de ces dendrites. Ces cellules sont assez profondes dans le BO, et ce type d'expérience pourrait être difficile, cependant il devrait être possible d'observer des dendrites dans la partie superficielle de la couche plexiforme externe (Mizrahi, 2007).

## **2. L'effet différentiel de l'apprentissage perceptif sur les deux populations de cellules granulaires $\alpha$ CamKII+ et $\alpha$ CamKII-.**

### **2.1 $\alpha$ CamKII définit deux sous-populations de cellules granulaires.**

#### **i. Caractérisation des deux sous-populations**

Les deux sous-populations identifiées ne sont pas distinguables d'un point de vue morphologique (à l'état basal) mais elles présentent des caractéristiques électrophysiologiques différentes. Il serait intéressant d'analyser d'autres propriétés des deux sous-populations. Pour cela, on pourrait envisager d'analyser leur connectivité différentielle par traçage monosynaptique rétrograde (Arenkiel et al., 2011). Par ailleurs, il serait très intéressant de définir leurs différences moléculaires par analyse de leur transcriptome. Ceci serait possible après FACS des deux populations à partir des souris  $\alpha$ CamKII-Tomato.

- ii. La plasticité structurelle associée à l'apprentissage perceptif n'affecte que cellules granulaires  $\alpha$ CamKII+

À la suite des résultats obtenus sur le rôle de  $\alpha$ CamKII dans la plasticité structurelle des nouveaux neurones en réponse à l'apprentissage perceptif, et sachant que  $\alpha$ CamKII n'est exprimée que dans 50% d'entre eux, nous avons étudié la morphologie des nouveaux neurones  $\alpha$ CamKII+ et  $\alpha$ CamKII- en réponse à cet apprentissage. Nous avons identifié les neurones grâce à une immunofluorescence anti- $\alpha$ CamKII. Seuls les neurones  $\alpha$ CamKII+ subissent une complexification de leurs dendrites et une augmentation de leur densité d'épines. Ceci est cohérent avec nos résultats montrant la nécessité de la traduction locale de  $\alpha$ CamKII dans les dendrites pour la plasticité structurelle associée à l'apprentissage, et également avec les données montrant que les cellules  $\alpha$ CamKII+ sont plus facilement activables lors d'une stimulation olfactive. On peut imaginer qu'à chaque exposition au lim+ et au lim-, l'activation des cellules granulaires  $\alpha$ CamKII+ permet la formation d'épines dendritiques, leur stabilisation, et la stabilisation des dendrites des cellules activées par cette stimulation. On peut imaginer qu' $\alpha$ CamKII soit le médiateur entre activité synaptique et remaniements des dendrites comme le suppose l'hypothèse synaptotrophique d'Hollis Cline (Cline & Haas, 2008). Pour tester le rôle causal d' $\alpha$ CamKII dans cette plasticité structurelle, nous comptons réaliser un knock-down d' $\alpha$ CamKII spécifiquement dans les cellules  $\alpha$ CamKII+ grâce à un ARN interférent sous la dépendance du promoteur  $\alpha$ CamKII.

- iii. L'apprentissage perceptif active à la fois les cellules  $\alpha$ CamKII+ et  $\alpha$ CamKII-

- a. Comment des expositions répétées peuvent-elles induire cette activation ?

Nous avons observé qu'après la période d'apprentissage perceptif, la densité de cellules c-Fos+ est fortement augmentée sans réexposition aux odorants. Ceci est en accord avec une étude montrant que l'apprentissage perceptif induit une augmentation de la réactivité des cellules granulaire du BO (Mandairon et al., 2008). Cette densité reste légèrement plus faible que lors d'une stimulation olfactive. Ces cellules activées sont autant  $\alpha$ CamKII- que  $\alpha$ CamKII+. Or les cellules  $\alpha$ CamKII- sont moins facilement activables que les cellules  $\alpha$ CamKII+ à l'état basal et lors d'une

stimulation olfactive. Ceci indique que, bien que l'apprentissage perceptif n'induisse pas de remodelage dendritique des cellules  $\alpha$ CamKII-, il a un effet sur cette population aussi. Les expositions quotidiennes au lim+ et lim- ont visiblement un effet sur l'activation des cellules granulaires  $\alpha$ CamKII- et  $\alpha$ CamKII+ sans distinction. Quels sont le/les mécanisme(s) via lesquels l'apprentissage perceptif permet cette activation des cellules granulaires ? Il pourrait s'agir de l'effet des courants excitateurs répétés venant des cellules mitrales qui finiraient par maintenir les cellules granulaires dans un état activé. Il pourrait aussi s'agir de l'action des fibres centrifuges venant de diverses régions du cerveau et qui sont essentielles à la modulation des processus olfactifs. Ces fibres comprennent des innervations provenant du cortex olfactif (Su et al., 2009), du système cholinergiques (Castillo, Carleton, Vincent, & Lledo, 1999), du système noradrénergique (McLean, Shipley, Nickell, Aston-Jones, & Reyher, 1989) ou encore du système sérotoninergiques (McLean & Shipley, 1987). Chacune de ces différentes fibres se projettent à la fois sur les cellules mitrales et sur les cellules granulaires pour moduler les signaux d'entrée et de sortie du bulbe.

- b. Les deux populations participent-elles à l'acquisition de la capacité de discrimination pendant l'apprentissage perceptif ?

Nous projetons de tester la contribution des deux sous-populations dans l'apprentissage en inhibant ou en activant spécifiquement les cellules  $\alpha$ CamKII+ via l'utilisation de DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs). Ceci est un projet en cours dans le cadre de la collaboration avec le laboratoire d'A. Saghatelian. Malheureusement, tester le rôle de la population  $\alpha$ CamKII- représente plus de difficultés puisque nous les définissons par l'absence de  $\alpha$ CamKII, elles n'ont donc aucun promoteur spécifique connu. On pourrait cependant essayer d'introduire les DREADDS dans les progéniteurs de la ZSV dorsale de façon à toucher le moins de cellules  $\alpha$ CamKII+ possible.

### **3. Les autres paradigmes de stimulation olfactive**

Nos collaborateurs ont analysé l'activation des cellules  $\alpha$ CamKII+ et- dans un paradigme d'apprentissage associatif et un test de la mémoire de court-terme.

Seul l'apprentissage associatif induit l'activation de davantage de cellules  $\alpha$ CamKII- par rapport à l'état basal. On peut donc penser que les cellules  $\alpha$ CamKII- ne sont recrutées que par des tâches qui impliquent la mémoire de long-terme. On peut imaginer que leur activation nécessite un processus lent comparés aux cellules  $\alpha$ CamKII+ qui semblent être activées par toute stimulation olfactive. Ce processus lent pourrait impliquer des projections centrifuges neuromodulatrices comme les projections noradrénergiques dont on sait qu'elles sont indispensables à l'apprentissage perceptif (Vinera et al., 2015).

## **Conclusion**

Au cours de ma thèse, nous avons montré pour la première fois un rôle de la traduction locale dans la plasticité extrême des nouveaux neurones du BO qui les rend « young and excitable ». Nous confirmons également les rôles médiateurs de FMRP et  $\alpha$ CamKII entre l'environnement et la plasticité structurelle des neurones. Ces résultats apportent des éléments de compréhension quant à la pathophysiologie du SXF qui en partie proviendrait de défauts de remodelages des circuits neuronaux en réponse à l'activité. De plus, nous montrons de manière inattendue que l'expression d' $\alpha$ CamKII définit deux populations de cellules granulaires. Ces deux sous-populations présentent des caractéristiques différentes et sont sujettes à des effets différents en réponse à l'apprentissage perceptif. Les cellules  $\alpha$ CamKII- demeurent mystérieuses car peu de paradigmes sont capables de les exciter. Cette étude devrait être poursuivie afin de définir la contribution des deux populations dans la plasticité du BO.



## **Bibliographie**



- Ahmed, R., Zha, X. M., Green, S. H., & Dailey, M. E. (2006). Synaptic activity and F-actin coordinately regulate CaMKII?? localization to dendritic postsynaptic sites in developing hippocampal slices. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(1), 37–51. doi:10.1016/j.mcn.2005.08.020
- Alonso, M., Lepousez, G., Sebastien, W., Bardy, C., Gabellec, M.-M., Torquet, N., & Lledo, P.-M. (2012). Activation of adult-born neurons facilitates learning and memory. *Nature Neuroscience*, 15(6), 897–904. doi:10.1038/nn.3108
- Alonso, M., Viollet, C., Gabellec, M.-M., Meas-Yedid, V., Olivo-Marin, J.-C., & Lledo, P.-M. (2006). Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(41), 10508–13. doi:10.1523/JNEUROSCI.2633-06.2006
- Andreassi, C., & Riccio, A. (2009). To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. *Trends in Cell Biology*, 19(9), 465–474. doi:10.1016/j.tcb.2009.06.001
- Antar, L. N., Afroz, R., Dichtenberg, J. B., Carroll, R. C., & Bassell, G. J. (2004). Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(11), 2648–2655. doi:10.1523/JNEUROSCI.0099-04.2004
- Antar, L. N., Li, C., Zhang, H., Carroll, R. C., & Bassell, G. J. (2006). Local functions for FMRP in axon growth cone motility and activity-dependent regulation of filopodia and spine synapses. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 32(1-2), 37–48. doi:10.1016/j.mcn.2006.02.001
- Arellano, J. I., Benavides-Piccione, R., Defelipe, J., & Yuste, R. (2007). Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Frontiers in Neuroscience*, 1(1), 131–143. doi:10.3389/neuro.01.1.1.010.2007
- Arenkiel, B. R., Hasegawa, H., Yi, J. J., Larsen, R. S., Wallace, M. L., Philpot, B. D., ... Ehlers, M. D. (2011). Activity-Induced Remodeling of Olfactory Bulb Microcircuits Revealed by Monosynaptic Tracing. *PLoS ONE*, 6(12), e29423. doi:10.1371/journal.pone.0029423
- Arruda-Carvalho, M., Restivo, L., Guskjolen, A., Epp, J. R., Elgersma, Y., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2014). Conditional Deletion of  $\gamma$ -CaMKII Impairs Integration of Adult-Generated Granule Cells into Dentate Gyrus Circuits and Hippocampus-Dependent Learning. *Journal of Neuroscience*, 34(36), 11919–11928. doi:10.1523/JNEUROSCI.0652-14.2014
- Ascano, M., Mukherjee, N., Bandaru, P., Miller, J. B., Nusbaum, J. D., Corcoran, D.



- L., ... Tuschl, T. (2012). FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. *Nature*, 492(7429), 382–386.  
doi:10.1038/nature11737
- Ashraf, S. I., McLoon, A. L., Sclarsic, S. M., & Kunes, S. (2006). Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell*, 124(1), 191–205. doi:10.1016/j.cell.2005.12.017
- Baj, G., Leone, E., Chao, M. V., & Tongiorgi, E. (2011). Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(40), 16813–16818.  
doi:10.1073/pnas.1014168108
- Bakker, C., Verheij, C., Willemsen, R., van der Helm, R., Oerlemans, F., Vermey, M., ... Willems, P. (1994). Fmr1 Knockout Mice: A Model to Study Fragile X Mental Retardation. *Cell*, 78(1), 23–33. doi:10.1016/0092-8674(94)90569-X
- Balu, R., Pressler, R. T., & Strowbridge, B. W. (2007). Multiple Modes of Synaptic Excitation of Olfactory Bulb Granule Cells. *Journal of Neuroscience*, 27(21), 5621–5632. doi:10.1523/JNEUROSCI.4630-06.2007
- Bardy, C., Alonso, M., Bouthour, W., & Lledo, P.-M. (2010). How, When, and Where New Inhibitory Neurons Release Neurotransmitters in the Adult Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience*, 30(50), 17023–17034. doi:10.1523/JNEUROSCI.4543-10.2010
- Bassell, G. J., & Warren, S. T. (2008). Fragile X Syndrome: Loss of Local mRNA Regulation Alters Synaptic Development and Function. *Neuron*, 60(2), 201–214.  
doi:10.1016/j.neuron.2008.10.004
- Bassell, G. J., Zhang, H., Byrd, A. L., Femino, A. M., Singer, R. H., Taneja, K. L., ... Kosik, K. S. (1998). Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(1), 251–265.
- Bear, M. F., Huber, K. M., & Warren, S. T. (2004). The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends in Neurosciences*, 27(7), 370–7.  
doi:10.1016/j.tins.2004.04.009
- Bechara, E. G., Didiot, M. C., Melko, M., Davidovic, L., Bensaid, M., Martin, P., ... Bardoni, B. (2009). A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation. *PLoS Biology*, 7(1), e16.  
doi:10.1371/journal.pbio.1000016
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilacqua, L. R. M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF- Dependent Phase in the Hippocampus. *Neuron*, 53(2), 261–277. doi:10.1016/j.neuron.2006.11.025

- Bhattacharya, A., Kaphzan, H., Alvarez-Dieppa, A. C., Murphy, J. P., Pierre, P., & Klann, E. (2012). Genetic Removal of p70 S6 Kinase 1 Corrects Molecular, Synaptic, and Behavioral Phenotypes in Fragile X Syndrome Mice. *Neuron*, 76(2), 325–337. doi:10.1016/j.neuron.2012.07.022
- Bhogal, B., Jepson, J. E., Savva, Y. A., Pepper, A. S.-R., Reenan, R. A., & Jongens, T. A. (2011). Modulation of dADAR-dependent RNA editing by the Drosophila fragile X mental retardation protein. *Nature Neuroscience*, 14(12), 1517–1524. doi:10.1038/nn.2950
- Blichenberg, A., Rehbein, M., Müller, R., Garner, C. C., Richter, D., & Kindler, S. (2001). Identification of a cis-acting dendritic targeting element in the mRNA encoding the alpha subunit of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *European Journal of Neuroscience*, 13, 1881–1888. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01565.x
- Böckers, T. M., Segger-Junius, M., Iglauer, P., Bockmann, J., Gundelfinger, E. D., Kreutz, M. R., ... Kreienkamp, H.-J. (2004). Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3' untranslated region of Shank1 mRNA. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(1), 182–190. doi:10.1016/j.mcn.2004.01.009
- Bostrom, C. a, Majaess, N.-M., Morch, K., White, E., Eadie, B. D., & Christie, B. R. (2013). Rescue of NMDAR-Dependent Synaptic Plasticity in Fmr1 Knock-Out Mice. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 1–9. doi:10.1093/cercor/bht237
- Bradshaw, K. D., Emptage, N. J., & Bliss, T. V. P. (2003). A role for dendritic protein synthesis in hippocampal late LTP. *European Journal of Neuroscience*, 18(11), 3150–3152. doi:10.1111/j.1460-9568.2003.03054.x
- Bramham, C. R., Worley, P. F., Moore, M. J., & Guzowski, J. F. (2008). The Immediate Early Gene Arc/Arg3.1: Regulation, Mechanisms, and Function. *Journal of Neuroscience*, 28(46), 11760–11767. doi:10.1523/JNEUROSCI.3864-08.2008
- Breton-Provencher, V., Lemasson, M., Peralta, M. R., & Saghatelian, A. (2009). Interneurons Produced in Adulthood Are Required for the Normal Functioning of the Olfactory Bulb Network and for the Execution of Selected Olfactory Behaviors. *Journal of Neuroscience*, 29(48), 15245–15257. doi:10.1523/JNEUROSCI.3606-09.2009
- Brill, M. S., Ninkovic, J., Winpenny, E., Hodge, R. D., Ozen, I., Yang, R., ... Götz, M. (2009). Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nature Neuroscience*, 12(12), 1524–1533. doi:10.1038/nn.2416
- Brown, V., Jin, P., Ceman, S., Darnell, J. C., O'Donnell, W. T., Tenenbaum, S. a., ... Warren, S. T. (2001). Microarray identification of FMRP-associated brain

- mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell*, 107(4), 477–487. doi:10.1016/S0092-8674(01)00568-2
- Buffington, S. A., Huang, W., & Costa-Mattioli, M. (2014). Translational Control in Synaptic Plasticity and Cognitive Dysfunction. *Annual Review of Neuroscience*, 37(1), 17–38. doi:10.1146/annurev-neuro-071013-014100
- Bunge, M. B. (1973). FINE STRUCTURE OF NERVE FIBERS AND STRUCTURE GROWTH OF NERVE OF ISOLATED IN CULTURE SYMPATHETIC NEURONS, 56, 713–735.
- Bureau, I., Shepherd, G. M. G., & Svoboda, K. (2008). Circuit and Plasticity Defects in the Developing Somatosensory Cortex of Fmr1 Knock-Out Mice. *Journal of Neuroscience*, 28(20), 5178–5188. doi:10.1523/JNEUROSCI.1076-08.2008
- Burgin, K. E., Waxham, M. N., Rickling, S., Westgate, S. a, Mobley, W. C., & Kelly, P. T. (1990). In situ hybridization histochemistry of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 10(6), 1788–1798.
- Buxbaum, A. R., Yoon, Y. J., Singer, R. H., & Park, H. Y. (2015). Single-molecule insights into mRNA dynamics in neurons. *Trends in Cell Biology*, 25(8), 468–475. doi:10.1016/j.tcb.2015.05.005
- Cajigas, I. J., Tushev, G., Will, T. J., Tom Dieck, S., Fuerst, N., & Schuman, E. M. (2012). The Local Transcriptome in the Synaptic Neuropil Revealed by Deep Sequencing and High-Resolution Imaging. *Neuron*, 74(8379), 453–466. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.036
- Cammalleri, M., Lütjens, R., Berton, F., King, A. R., Simpson, C., Francesconi, W., & Sanna, P. P. (2003). Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14368–14373. doi:10.1073/pnas.2336098100
- Campbell, D. S., & Holt, C. E. (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*, 32(6), 1013–1026. doi:10.1016/S0896-6273(01)00551-7
- Carleton, A., Petreanu, L. T., Lansford, R., Alvarez-Buylla, A., & Lledo, P.-M. (2003). Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 6(5), 507–518. doi:10.1038/nn1048
- Caroni, P., Donato, F., & Muller, D. (2012). Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(7), 478–490. doi:10.1038/nrn3258
- Castillo, P. E., Carleton, A., Vincent, J. D., & Lledo, P. M. (1999). Multiple and

- opposing roles of cholinergic transmission in the main olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(21), 9180–9191.
- Ceman, S. (2003). Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Human Molecular Genetics*, 12(24), 3295–3305. doi:10.1093/hmg/ddg350
- Chen, E., Sharma, M. R., Shi, X., Agrawal, R. K., & Joseph, S. (2014). Fragile X mental retardation protein regulates translation by binding directly to the ribosome. *Molecular Cell*, 54(3), 407–417. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.023
- Chow, D. K., Groszer, M., Pribadi, M., Machniki, M., Carmichael, S. T., Liu, X., & Trachtenberg, J. T. (2009). Laminar and compartmental regulation of dendritic growth in mature cortex. *Nature Neuroscience*, 12(2), 116–118. doi:10.1038/nn.2255
- Christie, S. B., Akins, M. R., Schwob, J. E., & Fallon, J. R. (2009). The FXG: a presynaptic fragile X granule expressed in a subset of developing brain circuits. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(5), 1514–1524. doi:10.1523/JNEUROSCI.3937-08.2009
- Cline, H., & Haas, K. (2008). The regulation of dendritic arbor development and plasticity by glutamatergic synaptic input: a review of the synaptotrophic hypothesis. *The Journal of Physiology*, 586(6), 1509–17. doi:10.1113/jphysiol.2007.150029
- Coffee, R. L., Williamson, A. J., Adkins, C. M., Gray, M. C., Page, T. L., & Broadie, K. (2012). In vivo neuronal function of the fragile X mental retardation protein is regulated by phosphorylation. *Human Molecular Genetics*, 21(4), 900–15. doi:10.1093/hmg/ddr527
- Comery, T. a, Harris, J. B., Willems, P. J., Oostra, B. a, Irwin, S. a, Weiler, I. J., & Greenough, W. T. (1997). Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(May), 5401–5404. Retrieved from <Go to ISI>://A1997WZ25700104
- Costa-Mattioli, M., & Sonenberg, N. (2008). *Chapter 5 Translational control of gene expression: A molecular switch for memory storage. Progress in Brain Research* (Vol. 169). Elsevier. doi:10.1016/S0079-6123(07)00005-2
- Costa-Mattioli, M., Sossin, W. S., Klann, E., & Sonenberg, N. (2009). Translational Control of Long-Lasting Synaptic Plasticity and Memory. *Neuron*, 61(1), 10–26. doi:10.1016/j.neuron.2008.10.055
- Cruz-Martín, A., Crespo, M., & Portera-Cailliau, C. (2010). Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(23), 7793–803.

doi:10.1523/JNEUROSCI.0577-10.2010

- Darnell, J. C., Fraser, C. E., Mostovetsky, O., Stefani, G., Jones, T. A., Eddy, S. R., & Darnell, R. B. (2005). Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes & Development*, 19(8), 903–18. doi:10.1101/gad.1276805
- Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y. S., Mele, A., Fraser, C. E., ... Darnell, R. B. (2011). FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*, 146(2), 247–61. doi:10.1016/j.cell.2011.06.013
- Daroles, L., Griboaud, S., Doulazmi, M., Scotto-lomassese, S., Dubacq, C., Mandairon, N., ... Caillé, I. (2015). Fragile X Mental Retardation Protein and Dendritic Local Translation of the Alpha Subunit of the Calcium / Calmodulin-Dependent Kinase II Messenger RNA Are Required for the Structural Plasticity Underlying Olfactory Learning, 1–11.
- Di Liegro, C. M., Schiera, G., & Di Liegro, I. (2014). Regulation of mRNA transport, localization and translation in the nervous system of mammals (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 33(4), 747–762. doi:10.3892/ijmm.2014.1629
- Dicthenberg, J. B., Swanger, S. A., Antar, L. N., Singer, R. H., & Bassell, G. J. (2008). A Direct Role for FMRP in Activity-Dependent Dendritic mRNA Transport Links Filopodial-Spine Morphogenesis to Fragile X Syndrome. *Developmental Cell*, 14(6), 926–939. doi:10.1016/j.devcel.2008.04.003
- Djuranovic, S., Nahvi, a., & Green, R. (2012). miRNA-Mediated Gene Silencing by Translational Repression Followed by mRNA Deadenylation and Decay. *Science*, 336(6078), 237–240. doi:10.1126/science.1215691
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D. a, García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), 703–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10380923>
- Doetsch, F., & Hen, R. (2005). Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol*, 15(1), 121–128. doi:10.1016/j.conb.2005.01.018
- Dölen, G., Osterweil, E., Rao, B. S. S., Smith, G. B., Auerbach, B. D., Chattarji, S., & Bear, M. F. (2007). Correction of Fragile X Syndrome in Mice. *Neuron*, 56(6), 955–962. doi:10.1016/j.neuron.2007.12.001
- Doll, C. a, & Broadie, K. (2014). Impaired activity-dependent neural circuit assembly and refinement in autism spectrum disorder genetic models. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(February), 30. doi:10.3389/fncel.2014.00030

- Doll, C. a., & Broadie, K. (2015). Activity-dependent FMRP requirements in development of the neural circuitry of learning and memory. *Development*, 142(7), 1346–1356. doi:10.1242/dev.117127
- Dong, H.-W., Heinbockel, T., Hamilton, K. A., Hayar, A., & Ennis, M. (2009). Metabotropic Glutamate Receptors and Dendrodendritic Synapses in the Main Olfactory Bulb. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170(1), 224–238. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.03891.x
- Doucette, W., Gire, D. H., Whitesell, J., Carmean, V., Lucero, M. T., & Restrepo, D. (2011). Associative Cortex Features in the First Olfactory Brain Relay Station. *Neuron*, 69(6), 1176–1187. doi:10.1016/j.neuron.2011.02.024
- Doucette, W., & Restrepo, D. (2008). Profound context-dependent plasticity of mitral cell responses in olfactory bulb. *PLoS Biology*, 6(10), e258. doi:10.1371/journal.pbio.0060258
- Doyle, M., & Kiebler, M. A. (2011). Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *The EMBO Journal*, 30(17), 3540–3552. doi:10.1038/emboj.2011.278
- Feng, Y., Gutekunst, C. a, Eberhart, D. E., Yi, H., Warren, S. T., & Hersch, S. M. (1997). Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(5), 1539–1547.
- Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*, 413(6852), 211–218. doi:10.1038/35093026
- Fukunaga, K., Muller, D., & Miyamoto, E. (1996). CaM kinase II in long-term potentiation. *Neurochemistry International*, 28(4), 343–358. doi:10.1016/0197-0186(95)00097-6
- Gabel, L. a, Won, S., Kawai, H., McKinney, M., Tartakoff, A. M., & Fallon, J. R. (2004). Visual experience regulates transient expression and dendritic localization of fragile X mental retardation protein. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(47), 10579–83. doi:10.1523/JNEUROSCI.2185-04.2004
- Gao, Y., Tatavarty, V., Korza, G., K., L. M., & Carson, J. H. (2008). Multiplexed Dendritic Targeting of ? Calcium Calmodulin-dependent Protein Kinase II, Neurogranin, and Activity-regulated Cytoskeleton-associated Protein RNAs by the A2 Pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 19(1), 308–317. doi:10.1091/mbc.E07
- Garner, C. C., Tucker, R. P., & Matus, a. (1988). Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature*, 336(6200), 674–677. doi:10.1038/336674a0

- Gelinas, J. N., & Nguyen, P. V. (2005). -Adrenergic Receptor Activation Facilitates Induction of a Protein Synthesis-Dependent Late Phase of Long-Term Potentiation. *Journal of Neuroscience*, 25(13), 3294–3303. doi:10.1523/JNEUROSCI.4175-04.2005
- Giuditta, a, Dettbarn, W. D., & Brzin, M. (1968). Protein synthesis in the isolated giant axon of the squid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 59(4), 1284–1287.
- Gross, C., Hoffmann, A., Bassell, G. J., & Berry-Kravis, E. M. (2015). Therapeutic Strategies in Fragile X Syndrome: From Bench to Bedside and Back. *Neurotherapeutics*. doi:10.1007/s13311-015-0355-9
- Harlow, E. G., Till, S. M., Russell, T. a., Wijetunge, L. S., Kind, P., & Contractor, A. (2010). Critical Period Plasticity Is Disrupted in the Barrel Cortex of Fmr1 Knockout Mice. *Neuron*, 65(3), 385–398. doi:10.1016/j.neuron.2010.01.024
- Harris, K. M., Fiala, J. C., & Ostroff, L. (2003). Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 358(1432), 745–748. doi:10.1098/rstb.2002.1254
- Harris, W. a, Holt, C. E., & Bonhoeffer, F. (1987). Retinal axons with and without their somata, growing to and arborizing in the tectum of *Xenopus* embryos: a time-lapse video study of single fibres in vivo. *Development (Cambridge, England)*, 101(1), 123–133.
- Håvik, B., Røkke, H., Bårdsen, K., Davanger, S., & Bramham, C. R. (2003). Bursts of high-frequency stimulation trigger rapid delivery of pre-existing  $\alpha$ -CaMKII mRNA to synapses: A mechanism in dendritic protein synthesis during long-term potentiation in adult awake rats. *European Journal of Neuroscience*, 17(April), 2679–2689. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02712.x
- Hayashi-Takagi, A., Yagishita, S., Nakamura, M., Shirai, F., Wu, Y. I., Loshbaugh, A. L., ... Kasai, H. (2015). Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. *Nature*, 525(7569), 333–8. doi:10.1038/nature15257
- He, C. X., & Portera-Cailliau, C. (2013). The trouble with spines in fragile X syndrome: density, maturity and plasticity. *Neuroscience*, 251, 120–8. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.03.049
- Hengst, U., Cox, L. J., Macosko, E. Z., & Jaffrey, S. R. (2006). Functional and selective RNA interference in developing axons and growth cones. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(21), 5727–5732. doi:10.1523/JNEUROSCI.5229-05.2006
- Ho, V., Lee, J., & Martin, K. (2011). The Cell Biology of Synaptic Plasticity. *Science*, 334(6056), 623–628. Retrieved from papers://fe7ca89d-6d18-4694-8f7e-

- Holtmaat, A. J. G. D., Trachtenberg, J. T., Wilbrecht, L., Shepherd, G. M., Zhang, X., Knott, G. W., & Svoboda, K. (2005). Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron*, 45(2), 279–291. doi:10.1016/j.neuron.2005.01.003
- Holtmaat, A., & Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(9), 647–58. doi:10.1038/nrn2699
- Hou, L., Antion, M. D., Hu, D., Spencer, C. M., Paylor, R., & Klann, E. (2006). Dynamic Translational and Proteasomal Regulation of Fragile X Mental Retardation Protein Controls mGluR-Dependent Long-Term Depression. *Neuron*, 51(4), 441–454. doi:10.1016/j.neuron.2006.07.005
- Huang, Y.-S., Carson, J. H., Barbarese, E., & Richter, J. D. (2003). Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes & Development*, 17(5), 638–53. doi:10.1101/gad.1053003
- Huang, Y.-S., Jung, M.-Y., Sarkissian, M., & Richter, J. D. (2002). N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and alpha CaMKII mRNA polyadenylation at synapses. *The EMBO Journal*, 21(9), 2139–48. doi:10.1093/emboj/21.9.2139
- Huber, K. M., Gallagher, S. M., Warren, S. T., & Bear, M. F. (2002). Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7746–7750. doi:10.1073/pnas.122205699
- Huber, K. M., Kayser, M. S., & Bear, M. F. (2000). Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5469), 1254–1257. doi:10.1126/science.288.5469.1254
- Hudmon, A., & Schulman, H. (2002). N <sup>2+</sup> /C <sup>+</sup> ALMODULIN -D <sup>+</sup> EPENDENT P <sup>+</sup> ROTEIN K <sup>+</sup> INASE II: The Role of Structure and Autoregulation in Cellular Function. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 473–510. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135410
- Hüttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J. B., Lorenz, M., Meng, X., ... Singer, R. H. (2005). Spatial regulation of  $\beta$ -actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature*, 438(7067), 512–515. doi:10.1038/nature04115
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., ... Kageyama, R. (2008). Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neuroscience*, 11(10), 1153–



1161. doi:10.1038/nn.2185

- Irwin, S. a, Swain, R. a, Christmon, C. a, Chakravarti, a, Weiler, I. J., & Greenough, W. T. (2000). Evidence for altered Fragile-X mental retardation protein expression in response to behavioral stimulation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 73(1), 87–93. doi:10.1006/nlme.1999.3914
- Janusz, A., Milek, J., Perycz, M., Pacini, L., Bagni, C., Kaczmarek, L., & Dziembowska, M. (2013). The Fragile X mental retardation protein regulates matrix metalloproteinase 9 mRNA at synapses. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(46), 18234–41. doi:10.1523/JNEUROSCI.2207-13.2013
- Job, C., & Eberwine, J. (2001). Identification of sites for exponential translation in living dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 13037–42. doi:10.1073/pnas.231485698
- Kao, D.-I., Aldridge, G. M., Weiler, I. J., & Greenough, W. T. (2010). Altered mRNA transport, docking, and protein translation in neurons lacking fragile X mental retardation protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15601–6. doi:10.1073/pnas.1010564107
- Kasai, H., Hayama, T., Ishikawa, M., Watanabe, S., Yagishita, S., & Noguchi, J. (2010). Learning rules and persistence of dendritic spines. *European Journal of Neuroscience*, 32(2), 241–249. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07344.x
- Kaufmann, W. E., & Reiss, a L. (1999). Molecular and cellular genetics of fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 88(1), 11–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10050961>
- Kay, L. M., & Laurent, G. (1999). Odor- and context-dependent modulation of mitral cell activity in behaving rats. *Nature Neuroscience*, 2(11), 1003–9. doi:10.1038/14801
- Kelsch, W., Lin, C.-W., Mosley, C. P., & Lois, C. (2009). A Critical Period for Activity-Dependent Synaptic Development during Olfactory Bulb Adult Neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 29(38), 11852–11858. doi:10.1523/JNEUROSCI.2406-09.2009
- Khandjian, E. W., Huot, M.-E., Tremblay, S., Davidovic, L., Mazroui, R., & Bardoni, B. (2004). Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), 13357–13362. doi:10.1073/pnas.0405398101
- Khoutorsky, A., Yanagiya, A., Gkogkas, C. G., Fabian, M. R., Prager-Khoutorsky, M., Cao, R., ... Sonenberg, N. (2013). Control of synaptic plasticity and memory via suppression of poly(A)-binding protein. *Neuron*, 78(2), 298–311.

doi:10.1016/j.neuron.2013.02.025

- Kiebler, M. A., & Bassell, G. J. (2006). Neuronal RNA Granules: Movers and Makers. *Neuron*, 51(6), 685–690. doi:10.1016/j.neuron.2006.08.021
- Kim, H., Gibboni, R., Kirkhart, C., & Bao, S. (2013). Impaired critical period plasticity in primary auditory cortex of fragile X model mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(40), 15686–92. doi:10.1523/JNEUROSCI.3246-12.2013
- Kim, M., Bellini, M., & Ceman, S. (2009). Fragile X mental retardation protein FMRP binds mRNAs in the nucleus. *Molecular and Cellular Biology*, 29(1), 214–28. doi:10.1128/MCB.01377-08
- Kleiman, R., Banker, G., & Steward, O. (1990). Differential subcellular localization of particular mRNAs in hippocampal neurons in culture. *Neuron*, 5(6), 821–830. doi:10.1016/0896-6273(90)90341-C
- Knott, G. W., Quairiaux, C., Genoud, C., & Welker, E. (2002). Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron*, 34(2), 265–273. doi:10.1016/S0896-6273(02)00663-3
- Knowles, R. B., Sabry, J. H., Martone, M. E., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Bassell, G. J., & Kosik, K. S. (1996). Translocation of RNA granules in living neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(24), 7812–7820.
- Kobayashi, H., Yamamoto, S., Maruo, T., & Murakami, F. (2005). Identification of a *cis*-acting element required for dendritic targeting of activity-regulated cytoskeleton-associated protein mRNA. *European Journal of Neuroscience*, 22(12), 2977–2984. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04508.x
- Koenig, E. (1967). Synthetic mechanisms in the axon. IV. In vitro incorporation of [3H]precursors into axonal protein and RNA. *Journal of Neurochemistry*, 14(4), 437–446.
- Kolb, B., Cioe, J., & Comeau, W. (2008). Contrasting effects of motor and visual spatial learning tasks on dendritic arborization and spine density in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(2), 295–300. doi:10.1016/j.nlm.2008.04.012
- Krichevsky, A. M., & Kosik, K. S. (2001). Neuronal RNA granules: A link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron*, 32, 683–696. doi:10.1016/S0896-6273(01)00508-6
- Krueger, D. D., & Bear, M. F. (2011). Toward Fulfilling the Promise of Molecular Medicine in Fragile X Syndrome. *Annual Review of Medicine*, 62(1), 411–429. doi:10.1146/annurev-med-061109-134644

- Krueger, D. D., Osterweil, E. K., Chen, S. P., Tye, L. D., & Bear, M. F. (2011). Cognitive dysfunction and prefrontal synaptic abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2587–2592. doi:10.1073/pnas.1013855108
- La Via, L., Bonini, D., Russo, I., Orlandi, C., Barlati, S., & Barbon, A. (2013). Modulation of dendritic AMPA receptor mRNA trafficking by RNA splicing and editing. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 617–31. doi:10.1093/nar/gks1223
- Laggerbauer, B., Ostareck, D., Keidel, E. M., Ostareck-Lederer, a, & Fischer, U. (2001). Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Human Molecular Genetics*, 10(4), 329–338.
- Lazarini, F., Mouthon, M.-A., Gheusi, G., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.-C., Lamarque, S., ... Lledo, P.-M. (2009). Cellular and Behavioral Effects of Cranial Irradiation of the Subventricular Zone in Adult Mice. *PLoS ONE*, 4(9), e7017. doi:10.1371/journal.pone.0007017
- Lee, W. C. a, Huang, H., Feng, G., Sanes, J. R., Brown, E. N., So, P. T., & Nedivi, E. (2006). Dynamic remodeling of dendritic arbors in GABAergic interneurons of adult visual cortex. *PLoS Biology*, 4(2), 271–280. doi:10.1371/journal.pbio.0040029
- Lee, W.-C. A., Chen, J. L., Huang, H., Leslie, J. H., Amitai, Y., So, P. T., & Nedivi, E. (2008). A dynamic zone defines interneuron remodeling in the adult neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50), 19968–19973. doi:10.1073/pnas.0810149105
- Leonard, A. S., Bayer, K.-U., Merrill, M. A., Lim, I. A., Shea, M. A., Schulman, H., & Hell, J. W. (2002). Regulation of Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Docking to N-Methyl-D-aspartate Receptors by Calcium/Calmodulin and - Actinin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 48441–48448. doi:10.1074/jbc.M205164200
- Leung, K.-M., van Horck, F. P., Lin, A. C., Allison, R., Standart, N., & Holt, C. E. (2006). Asymmetrical  $\beta$ -actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1. *Nature Neuroscience*, 9(10), 1247–1256. doi:10.1038/nn1775
- Leung, L. C., Urbančič, V., Baudet, M.-L., Dwivedy, A., Bayley, T. G., Lee, A. C., ... Holt, C. E. (2013). Coupling of NF-protocadherin signaling to axon guidance by cue-induced translation. *Nature Neuroscience*, 16(2), 166–173. doi:10.1038/nn.3290
- Li, C. (2009). Fragile X Mental Retardation Protein is involved in protein synthesis-dependent collapse of growth cones induced by Semaphorin-3A. *Frontiers in Neural Circuits*, 3(September), 1–10. doi:10.3389/neuro.04.011.2009

- Lim, D. a, & Alvarez-buylla, A. (2014). Adult neural stem cells stake their ground. *Trends in Neurosciences*, 37(10), 563–571. doi:10.1016/j.tins.2014.08.006
- Liu, X.-B., & Murray, K. D. (2012). Neuronal excitability and calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II: location, location, location. *Epilepsia*, 53 Suppl 1, 45–52. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03474.x
- Lynch, M. A. (2004). Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews*, 84(1), 87–136. doi:10.1152/physrev.00014.2003.
- Magariños, a M., McEwen, B. S., Flügge, G., & Fuchs, E. (1996). Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(10), 3534–3540.
- Mandairon, N., Didier, A., & Linster, C. (2008). Odor enrichment increases interneurons responsiveness in spatially defined regions of the olfactory bulb correlated with perception. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(1), 178–84. doi:10.1016/j.nlm.2008.02.008
- Mandairon, N., Sacquet, J., Garcia, S., Ravel, N., Jourdan, F., & Didier, A. (2006). Neurogenic correlates of an olfactory discrimination task in the adult olfactory bulb. *The European Journal of Neuroscience*, 24(12), 3578–88. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05235.x
- Mandairon, N., Sacquet, J., Jourdan, F., & Didier, a. (2006). Long-term fate and distribution of newborn cells in the adult mouse olfactory bulb: Influences of olfactory deprivation. *Neuroscience*, 141(1), 443–451. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.03.066
- Mandairon, N., Stack, C., Kiselycznyk, C., & Linster, C. (2006). Broad activation of the olfactory bulb produces long-lasting changes in odor perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(36), 13543–8. doi:10.1073/pnas.0602750103
- Mandairon, N., Sultan, S., Nouvian, M., Sacquet, J., & Didier, A. (2011). Involvement of Newborn Neurons in Olfactory Associative Learning? The Operant or Non-operant Component of the Task Makes All the Difference. *Journal of Neuroscience*, 31(35), 12455–12460. doi:10.1523/JNEUROSCI.2919-11.2011
- Martin, C. (2004). Learning Modulation of Odor-Induced Oscillatory Responses in the Rat Olfactory Bulb: A Correlate of Odor Recognition? *Journal of Neuroscience*, 24(2), 389–397. doi:10.1523/JNEUROSCI.3433-03.2004
- Matsuzaki, M., Naoki, H., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429(June), 761–766. doi:10.1038/nature02594.1.

- Mayford, M., Baranes, D., Podsypanina, K., & Kandel, E. R. (1996). The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), 13250–13255. doi:10.1073/pnas.93.23.13250
- McLean, J. H., & Shipley, M. T. (1987). Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: II. Changes in fiber distribution during development. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 7(10), 3029–3039.
- McLean, J. H., Shipley, M. T., Nickell, W. T., Aston-Jones, G., & Reyher, C. K. (1989). Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 285(3), 339–349. doi:10.1002/cne.902850305
- Merianda, T. T., Lin, A. C., Lam, J. S. Y., Vuppalachchi, D., Willis, D. E., Karin, N., ... Twiss, J. L. (2009). A functional equivalent of endoplasmic reticulum and Golgi in axons for secretion of locally synthesized proteins. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 40(2), 128–142. doi:10.1016/j.mcn.2008.09.008
- Michel, C. I. (2004). Defective Neuronal Development in the Mushroom Bodies of Drosophila Fragile X Mental Retardation 1 Mutants. *Journal of Neuroscience*, 24(25), 5798–5809. doi:10.1523/JNEUROSCI.1102-04.2004
- Miller, S., Yasuda, M., Coats, J. K., Jones, Y., Martone, M. E., & Mayford, M. (2002). Disruption of dendritic translation of CaMKII $\alpha$  impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron*, 36(3), 507–519. doi:10.1016/S0896-6273(02)00978-9
- Miyashiro, K. Y., Beckel-Mitchener, a, Purk, T. P., Becker, K. G., Barret, T., Liu, L., ... Eberwine, J. (2003). RNA cargoes associating with in cellular functioning in Fmr1 Fmr1 reveal deficits null mice. *Neuron*, 37, 417–431. doi:10.1016/S0896-6273(03)00034-5
- Mizrahi, A. (2007). Dendritic development and plasticity of adult-born neurons in the mouse olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 10(4), 444–52. doi:10.1038/nn1875
- Mizrahi, A., & Katz, L. C. (2003). Dendritic stability in the adult olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 6(11), 1201–1207. doi:10.1038/nn1133
- Moreno, M. M., Linster, C., Escanilla, O., Sacquet, J., Didier, A., & Mandairon, N. (2009). Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(42), 17980–5. doi:10.1073/pnas.0907063106
- Mori, Y., Imaizumi, K., Katayama, T., Yoneda, T., & Tohyama, M. (2000). Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of alpha-CaMKII regulate its

- dendritic targeting. *Nature Neuroscience*, 3(11), 1079–1084. doi:10.1038/80591
- Moser, M. B., Trommald, M., Egeland, T., & Andersen, P. (1997). Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *Journal of Comparative Neurology*, 380(3), 373–381. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19970414)380:3<373::AID-CNE6>3.0.CO;2-#
- Muddashetty, R. S., Kelić, S., Gross, C., Xu, M., & Bassell, G. J. (2007). Dysregulated metabotropic glutamate receptor-dependent translation of AMPA receptor and postsynaptic density-95 mRNAs at synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(20), 5338–5348. doi:10.1523/JNEUROSCI.0937-07.2007
- Muddashetty, R. S., Nalavadi, V. C., Gross, C., Yao, X., Xing, L., Laur, O., ... Bassell, G. J. (2011). Reversible Inhibition of PSD-95 mRNA Translation by miR-125a, FMRP Phosphorylation, and mGluR Signaling. *Molecular Cell*, 42(5), 673–688. doi:10.1016/j.molcel.2011.05.006
- Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 8(September), 1–19. doi:10.3389/fncir.2014.00098
- Nakamoto, M., Nalavadi, V., Epstein, M. P., Narayanan, U., Bassell, G. J., & Warren, S. T. (2007). Fragile X mental retardation protein deficiency leads to excessive mGluR5-dependent internalization of AMPA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15537–15542. doi:10.1073/pnas.0707484104
- Napoli, I., Mercaldo, V., Boyl, P. P., Eleuteri, B., Zalfa, F., De Rubeis, S., ... Bagni, C. (2008). The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. *Cell*, 134(6), 1042–54. doi:10.1016/j.cell.2008.07.031
- Néant-Fery, M., Pérès, E., Nasrallah, C., Kessner, M., Gribaudo, S., Greer, C. A., ... Caillé, I. (2012). A role for dendritic translation of CaMKII $\alpha$  mRNA in olfactory plasticity. *PloS One*, 7(6), e40133. doi:10.1371/journal.pone.0040133
- Nissant, A., Bardy, C., Katagiri, H., Murray, K., & Lledo, P.-M. (2009). Adult neurogenesis promotes synaptic plasticity in the olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 12(6), 728–30. doi:10.1038/nn.2298
- Nissant, A., & Pallotto, M. (2011). Integration and maturation of newborn neurons in the adult olfactory bulb - from synapses to function. *European Journal of Neuroscience*, 33(6), 1069–1077. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07605.x
- Nosyreva, E. D., & Huber, K. M. (2006). Metabotropic receptor-dependent long-term depression persists in the absence of protein synthesis in the mouse model of

- fragile X syndrome. *Journal of Neurophysiology*, 95(Bakker 1994), 3291–3295. doi:10.1152/jn.01316.2005
- Oddi, D., Crusio, W. E., D'Amato, F. R., & Pietropaolo, S. (2013). Monogenic mouse models of social dysfunction: Implications for autism. *Behavioural Brain Research*, 251, 75–84. doi:10.1016/j.bbr.2013.01.002
- Ohkawa, N., Fujitani, K., Tokunaga, E., Furuya, S., & Inokuchi, K. (2007). The microtubule destabilizer stathmin mediates the development of dendritic arbors in neuronal cells. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 8), 1447–56. doi:10.1242/jcs.001461
- Osterweil, E. K., Krueger, D. D., Reinhold, K., & Bear, M. F. (2010). Hypersensitivity to mGluR5 and ERK1/2 Leads to Excessive Protein Synthesis in the Hippocampus of a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Journal of Neuroscience*, 30(46), 15616–15627. doi:10.1523/JNEUROSCI.3888-10.2010
- Pallotto, M., Nissant, A., Fritschy, J.-M., Rudolph, U., Sassoe-Pognetto, M., Panzanelli, P., & Lledo, P.-M. (2012). Early Formation of GABAergic Synapses Governs the Development of Adult-Born Neurons in the Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience*. doi:10.1523/JNEUROSCI.0214-12.2012
- Pan, F., Aldridge, G. M., Greenough, W. T., & Gan, W.-B. (2010). Dendritic spine instability and insensitivity to modulation by sensory experience in a mouse model of fragile X syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(41), 17768–73. doi:10.1073/pnas.1012496107
- Pasciuto, E., & Bagni, C. (2014). SnapShot: FMRP mRNA Targets and Diseases. *Cell*, 158(6), 1446–1446.e1. doi:10.1016/j.cell.2014.08.035
- Pattinson, D., Baccei, M., Karadottir, R., Torsney, C., Moss, A., McCutcheon, J., ... Fitzgerald, M. (2006). Aberrant dendritic branching and sensory inputs in the superficial dorsal horn of mice lacking CaMKIIalpha autophosphorylation. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 33(1), 88–95. doi:10.1016/j.mcn.2006.06.010
- Petreanu, L., & Alvarez-Buylla, A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(14), 6106–6113. doi:20026588
- Pfeiffer, B. E., & Huber, K. M. (2007). Fragile X Mental Retardation Protein Induces Synapse Loss through Acute Postsynaptic Translational Regulation. *Journal of Neuroscience*, 27(12), 3120–3130. doi:10.1523/JNEUROSCI.0054-07.2007
- Pi, H. J., Otmakhov, N., El Gaamouch, F., Lemelin, D., De Koninck, P., & Lisman, J. (2010). CaMKII control of spine size and synaptic strength: Role of

- phosphorylation states and nonenzymatic action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14437–14442. doi:10.1073/pnas.1009268107
- Qin, M., Xia, Z., Huang, T., & Smith, C. (2011). Effects of chronic immobilization stress on anxiety-like behavior and basolateral amygdala morphology in Fmr1 knockout mice. *Neuroscience*, 194, 282–290. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.047
- Rampon, C., Tang, Y. P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., & Tsien, J. Z. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature Neuroscience*, 3(3), 238–244. doi:10.1038/72945
- Roberts, T. F., Tschida, K. a, Klein, M. E., & Mooney, R. (2010). Rapid spine stabilization and synaptic enhancement at the onset of behavioural learning. *Nature*, 463(7283), 948–952. doi:10.1038/nature08759
- Robinson, T. E. (1999). Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *European Journal of Neuroscience*, 11(5), 1598–1604. doi:10.1046/j.1460-9568.1999.00576.x
- Rochefort, C., Gheusi, G., Vincent, J.-D., & Lledo, P.-M. (2002). Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(7), 2679–89. doi:20026260
- Rook, M. S., Lu, M., & Kosik, K. S. (2000). CaMKIIalpha 3' untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(17), 6385–6393. doi:20/17/6385 [pii]
- Santos, A. R., Kanellopoulos, A. K., & Bagni, C. (2014). Learning and behavioral deficits associated with the absence of the fragile X mental retardation protein : what a fly and mouse model can teach us.
- Schaeffer, C., Bardoni, B., Mandel, J. L., Ehresmann, B., Ehresmann, C., & Moine, H. (2001). The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO Journal*, 20(17), 4803–4813. doi:10.1093/emboj/20.17.4803
- Scharf, S. H., Jaeschke, G., Wettstein, J. G., & Lindemann, L. (2014). Metabotropic glutamate receptor 5 as drug target for Fragile X syndrome. *Current Opinion in Pharmacology*, 20, 124–134. doi:10.1016/j.coph.2014.11.004
- Schilit Nitenson, a., Stackpole, E. E., Truszkowski, T. L. S., Midroit, M., Fallon, J. R., & Bath, K. G. (2015). Fragile X Mental Retardation Protein Regulates Olfactory Sensitivity But Not Odorant Discrimination. *Chemical Senses*, 40(5), 345–350.



doi:10.1093/chemse/bjv019

- Schulman, H. (2004). Activity-Dependent Regulation of Calcium / Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Localization. *Regulation*, 24(39), 8399 – 8403. doi:10.1523/JNEUROSCI.3606-04.2004
- Scotto-Lomassese, S., Nissant, A., Mota, T., Néant-Féry, M., Oostra, B. a, Greer, C. A., ... Caillé, I. (2011). Fragile X mental retardation protein regulates new neuron differentiation in the adult olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(6), 2205–15. doi:10.1523/JNEUROSCI.5514-10.2011
- Shepherd, G. M., Chen, W. R., Willhite, D., Migliore, M., & Greer, C. A. (2007). The olfactory granule cell: From classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain Research Reviews*, 55, 373–382. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.03.005
- Shigeoka, T., Lu, B., & Holt, C. E. (2013). RNA-based mechanisms underlying axon guidance. *The Journal of Cell Biology*, 202(7), 991–9. doi:10.1083/jcb.201305139
- Shiina, N., Shinkura, K., & Tokunaga, M. (2005). A novel RNA-binding protein in neuronal RNA granules: regulatory machinery for local translation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(17), 4420–4434. doi:10.1523/JNEUROSCI.0382-05.2005
- Shonesy, B. C., Jalan-Sakrikar, N., Cavener, V. S., & Colbran, R. J. (2014). CaMKII: A molecular substrate for synaptic plasticity and memory. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 122, 61–87. doi:10.1016/B978-0-12-420170-5.00003-9
- Siegel, G., Saba, R., & Schratt, G. (2011). microRNAs in neurons: manifold regulatory roles at the synapse. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21(4), 491–497. doi:10.1016/j.gde.2011.04.008
- Silva, A. J., Stevens, C. F., & Tonegawa, S. (1992). Deficient hippocampal long-term potentiation in  $\alpha$ -calcium- calmodulin kinase II mutant mice. *Science*, 257(July), 201–206.
- Smith, W. B., Starck, S. R., Roberts, R. W., & Schuman, E. M. (2005). Dopaminergic Stimulation of Local Protein Synthesis Enhances Surface Expression of GluR1 and Synaptic Transmission in Hippocampal Neurons. *Neuron*, 45(5), 765–779. doi:10.1016/j.neuron.2005.01.015
- Soden, M. E., & Chen, L. (2010). Fragile X Protein FMRP Is Required for Homeostatic Plasticity and Regulation of Synaptic Strength by Retinoic Acid. *Journal of Neuroscience*, 30(50), 16910–16921. doi:10.1523/JNEUROSCI.3660-10.2010

- Steward, O., & Levy, W. B. (1982). Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in grSteward, O., & Levy, W. B. (1982). Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *The Journal of Neuro. The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2(3), 284–291. doi:0270-6474/82/0203-0284
- Steward, O., Steward, O., Wallace, C. S., Wallace, C. S., Lyford, G. L., Lyford, G. L., ... Worley, P. F. (1998). Synaptic Activation Causes the mRNA for the IEG Arc to Localize Selectively near Activated Postsynaptic Sites on Dendrites. *Cell*, 21, 741–751.
- Su, C.-Y., Menuz, K., & Carlson, J. R. (2009). Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits. *Cell*, 139(1), 45–59. doi:10.1016/j.cell.2009.09.015
- Subramanian, M., Rage, F., Tabet, R., Flatter, E., Mandel, J.-L., & Moine, H. (2011). G–quadruplex RNA structure as a signal for neurite mRNA targeting. *EMBO Reports*, 12(7), 697–704. doi:10.1038/embor.2011.76
- Sultan, S., Madaïron, N., Kermen, F., Garcia, S., Sacquet, J., & Didier, A. (2010). Learning-dependent neurogenesis in the olfactory bulb determines long-term olfactory memory. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(7), 2355–63. doi:10.1096/fj.09-151456
- Sultan, S., Rey, N., Sacquet, J., Madaïron, N., & Didier, A. (2011). Newborn Neurons in the Olfactory Bulb Selected for Long-Term Survival through Olfactory Learning Are Prematurely Suppressed When the Olfactory Memory Is Erased. *Journal of Neuroscience*, 31(42), 14893–14898. doi:10.1523/JNEUROSCI.3677-11.2011
- Swanger, S. A., & Bassell, G. J. (2013). Dendritic protein synthesis in the normal and diseased brain. *Neuroscience*, 232, 106–127. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.12.003
- Taha, E., Gildish, I., Gal-Ben-Ari, S., & Rosenblum, K. (2013). The role of eEF2 pathway in learning and synaptic plasticity. *Neurobiology of Learning and Memory*, 105, 100–106. doi:10.1016/j.nlm.2013.04.015
- Takei, N. (2001). Brain-derived Neurotrophic Factor Enhances Neuronal Translation by Activating Multiple Initiation Processes. COMPARISON WITH THE EFFECTS OF INSULIN. *Journal of Biological Chemistry*, 276(46), 42818–42825. doi:10.1074/jbc.M103237200
- Takemura, R., Okabe, S., Umeyama, T., Kanai, Y., Cowan, N. J., & Hirokawa, N. (1992). Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *Journal*

- of Cell Science*, 103 ( Pt 4, 953–964.
- Tang, K., Liu, C., Kuluz, J., & Hu, B. (2004). Alterations of CaMKII after hypoxia-ischemia during brain development. *Journal of Neurochemistry*, 91(2), 429–37. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02733.x
- Tashiro, a, Minden, a, & Yuste, R. (2000). Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 10(10), 927–938. doi:10.1093/cercor/10.10.927
- Tennyson, V. M. (1970). The fine structure of the axon and growth cone of the dorsal root neuroblast of the rabbit embryo. *Journal of Cell Biology*, 44(1), 62–79. doi:10.1083/jcb.44.1.62
- Tessier, C. R., & Broadie, K. (2008). Drosophila fragile X mental retardation protein developmentally regulates activity-dependent axon pruning. *Development (Cambridge, England)*, 135(8), 1547–57. doi:10.1242/dev.015867
- Thomas, M. G., Pascual, M. L., Maschi, D., Luchelli, L., & Boccaccio, G. L. (2014). Synaptic control of local translation: the plot thickens with new characters. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(12), 2219–39. doi:10.1007/s00018-013-1506-y
- Till, S. M., Wijetunge, L. S., Seidel, V. G., Harlow, E., Wright, A. K., Bagni, C., ... Kind, P. C. (2012). Altered maturation of the primary somatosensory cortex in a mouse model of fragile X syndrome. *Human Molecular Genetics*, 21(10), 2143–56. doi:10.1093/hmg/ddc030
- Tiruchinapalli, D. M., Oleynikov, Y., Kelic, S., Shenoy, S. M., Hartley, A., Stanton, P. K., ... Bassell, G. J. (2003). Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(8), 3251–3261. doi:23/8/3251 [pii]
- Todd, P. K., & Mack, K. J. (2000). Sensory stimulation increases cortical expression of the fragile X mental retardation protein in vivo. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 80(1), 17–25.
- Todd, P. K., Malter, J. S., & Mack, K. J. (2003). Whisker stimulation-dependent translation of FMRP in the barrel cortex requires activation of type I metabotropic glutamate receptors. *Molecular Brain Research*, 110(2), 267–278. doi:10.1016/S0169-328X(02)00657-5
- Tortosa, E., Montenegro-Venegas, C., Benoist, M., Härtel, S., González-Billault, C., Esteban, J. a., & Avila, J. (2011). Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is required for dendritic spine development and synaptic maturation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(47), 40638–40648. doi:10.1074/jbc.M111.271320

- Trachtenberg, J. T., Chen, B. E., Knott, G. W., Feng, G., Sanes, J. R., Welker, E., & Svoboda, K. (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, 420(6917), 788–794. doi:10.1038/nature01273
- Tronel, S., Fabre, A., Charrier, V., Oliet, S. H. R., Gage, F. H., & Abrus, D. N. (2010). Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(17), 7963–8. doi:10.1073/pnas.0914613107
- Turner, a M., & Greenough, W. T. (1984). Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. *Brain Research*, 329(1-2), 195–203. doi:10.1016/0006-8993(85)90525-6
- Udagawa, T., Swanger, S. A., Takeuchi, K., Kim, J. H., Nalavadi, V., Shin, J., ... Richter, J. D. (2012). Bidirectional Control of mRNA Translation and Synaptic Plasticity by the Cytoplasmic Polyadenylation Complex. *Molecular Cell*, 47(2), 253–266. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.016
- Van Harreveld, A., & Fifkova, E. (1975). Swelling of dendritic spines in the fascia dentata after stimulation of the perforant fibers as a mechanism of post-tetanic potentiation. *Experimental Neurology*, 49(3), 736–749.
- Vanderklish, P. W., & Edelman, G. M. (2002). Dendritic spines elongate after stimulation of group 1 metabotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), 1639–1644. doi:10.1073/pnas.032681099
- Vinera, J., Kermen, F., Sacquet, J., Didier, A., Mandairon, N., & Richard, M. (2015). Olfactory perceptual learning requires action of noradrenaline in the olfactory bulb: comparison with olfactory associative learning. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 22(3), 192–196. doi:10.1101/lm.036608.114
- Volkmar, F. R., & Greenough, W. T. (1972). Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. *Science (New York, N.Y.)*, 176(42), 1445–1447. doi:10.1126/science.176.4042.1445
- Vries, B. B. a De, Halley, D. J. J., Oostra, B. a, & Niermeijer, M. F. (1998). The fragile X syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 35, 579–589.
- Wan, L., Dockendorff, T. C., & Jongens, T. a. (2000). Homolog of the Fragile X Mental Retardation Protein, 20(22), 8536–8547.
- Wang, W., Zhu, J. Z., Chang, K. T., & Min, K.-T. (2012). DSCR1 interacts with FMRP and is required for spine morphogenesis and local protein synthesis. *The EMBO Journal*, 31(18), 3655–3666. doi:10.1038/emboj.2012.190
- Weiler, I. J., & Greenough, W. T. (1993). Metabotropic glutamate receptors trigger

- postsynaptic protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(15), 7168–7171.  
doi:10.1073/pnas.90.15.7168
- Weiler, I. J., Irwin, S. a, Klintsova, a Y., Spencer, C. M., Brazelton, a D., Miyashiro, K., ... Greenough, W. T. (1997). Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), 5395–5400. doi:10.1073/pnas.94.10.5395
- Whitman, M. C., & Greer, C. A. (2007). Synaptic integration of adult-generated olfactory bulb granule cells: basal axodendritic centrifugal input precedes apical dendrodendritic local circuits. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(37), 9951–9961.  
doi:10.1523/JNEUROSCI.1633-07.2007
- Whitman, M. C., & Greer, C. A. (2009). Adult neurogenesis and the olfactory system. *Progress in Neurobiology*, 89(2), 162–175. doi:10.1016/j.pneurobio.2009.07.003
- Wu, G. Y., & Cline, H. T. (1998). Stabilization of dendritic arbor structure in vivo by CaMKII. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5348), 222–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9422694>
- Wu, K. Y., Hengst, U., Cox, L. J., Macosko, E. Z., Jeromin, A., Urquhart, E. R., & Jaffrey, S. R. (2005). Local translation of RhoA regulates growth cone collapse. *Nature*, 436(7053), 1020–1024. doi:10.1038/nature03885
- Xing, L., & Bassell, G. J. (2012). mRNA Localization: An Orchestration of Assembly, Traffic and Synthesis. *Traffic*, (3), n/a–n/a. doi:10.1111/tra.12004
- Xu, T., Yu, X., Perlik, A. J., Tobin, W. F., Zweig, J. a, Tennant, K., ... Zuo, Y. (2009). Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature*, 462(7275), 915–919. doi:10.1038/nature08389
- Yamaguchi, M., & Mori, K. (2005). Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27), 9697–9702. doi:10.1073/pnas.0406082102
- Yang, G., Pan, F., & Gan, W.-B. (2009). Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*, 462(7275), 920–924.  
doi:10.1038/nature08577
- Yao, J., Sasaki, Y., Wen, Z., Bassell, G. J., & Zheng, J. Q. (2006). An essential role for beta-actin mRNA localization and translation in Ca<sup>2+</sup>-dependent growth cone guidance. *Nature Neuroscience*, 9(10), 1265–1273. doi:10.1038/nn1773
- Zalfa, F., Eleuteri, B., Dickson, K. S., Mercaldo, V., De Rubeis, S., di Penta, A., ...

- Bagni, C. (2007). A new function for the fragile X mental retardation protein in regulation of PSD-95 mRNA stability. *Nature Neuroscience*, 10(5), 578–587. doi:10.1038/nn1893
- Zang, T., Maksimova, M. a, Cowan, C. W., Bassel-Duby, R., Olson, E. N., & Huber, K. M. (2013). Postsynaptic FMRP bidirectionally regulates excitatory synapses as a function of developmental age and MEF2 activity. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 56, 39–49. doi:10.1016/j.mcn.2013.03.002
- Zeier, Z., Kumar, A., Bodhinathan, K., Feller, J. A., Foster, T. C., & Bloom, D. C. (2009). Fragile X mental retardation protein replacement restores hippocampal synaptic function in a mouse model of fragile X syndrome. *Gene Therapy*, 16(9), 1122–1129. doi:10.1038/gt.2009.83
- Zhang, J., Hou, L., Klann, E., & Nelson, D. L. (2009). Altered Hippocampal Synaptic Plasticity in the Fmr1 Gene Family Knockout Mouse Models, 2572–2580. doi:10.1152/jn.90558.2008.
- Zhang, Y. Q., Bailey, A. M., Matthies, H. J. G., Renden, R. B., Smith, M. a., Speese, S. D., ... Broadie, K. (2001). Drosophila fragile x-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. *Cell*, 107(5), 591–603. doi:10.1016/S0092-8674(01)00589-X
- Zhong, J., Zhang, T., & Bloch, L. M. (2006). Dendritic mRNAs encode diversified functionalities in hippocampal pyramidal neurons. *BMC Neuroscience*, 7, 17. doi:10.1186/1471-2202-7-17
- Zou, D. J., & Cline, H. T. (1999). Postsynaptic calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is required to limit elaboration of presynaptic and postsynaptic neuronal arbors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(20), 8909–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516310>

